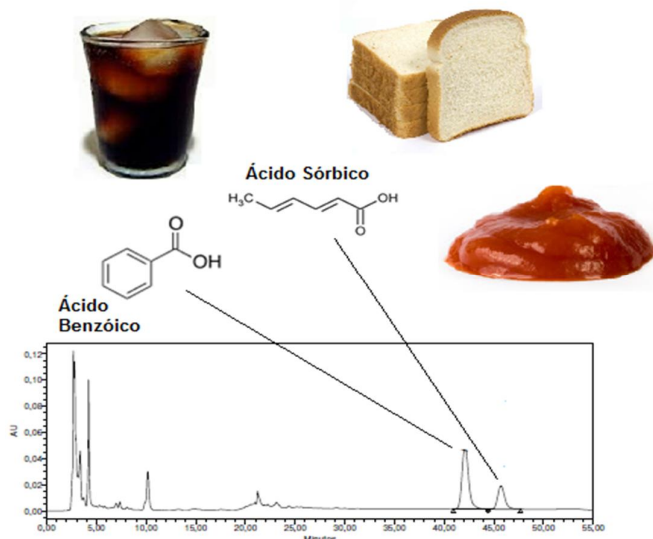




ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA



Validação de um Método de Cromatografia de Alta Eficiência para Determinação de Conservantes em Géneros Alimentícios

JOÃO CARLOS DUARTE COSTA
(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

(Documento final)

Orientador (es):

Doutora Maria Celeste Serra
Doutora Elsa Reis Vasco

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Isabel João
Vogais:

Doutora Paula Alvito
Prof. Doutor Amin Karmali
Doutora Elsa Reis Vasco

Fevereiro de 2015

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no âmbito do 2º Ciclo em Engenharia Química e Biológica . ramo de Bioprocessos do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, no Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, sob a orientação da Doutora Elsa Vasco e da Professora Doutora Celeste Serra.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer às minhas orientadoras, Doutora Elsa Reis Vasco e Professora Maria Celeste Serra, por todos os conhecimentos passados, pela amizade e por todo o apoio prestado ao longo desta experiência única, que me permitiu evoluir pessoal e profissionalmente.

Agradeço também ao Projeto Nacional MONITADITIVOS, no qual este trabalho esta inserido, financiado pelo Instituto nacional de Saúde doutor Ricardo Jorge, IP, essencial para a realização deste trabalho.

Como todo este trabalho é o culminar de toda uma viagem de seis anos não poderia deixar de agradecer ao Rafael Clemente por toda a paciência que teve comigo e por todas as palavras de motivação e, às minhas amigas Rita Bito, Catarina Lino, Carolina Santos, Carla Rodrigues, Inês Fraga, Helena Moraes, Catarina Moraes, Inês Curado e aos meus padrinhos do ISEL Inês Nicolau e José Miguel Coutinho, por toda a amizade e pelos momentos marcantes de muita felicidade e diversão.

Deixo também um grande obrigado à minha amiga e parceira de estágio Mafalda Silva, pela partilha de momentos engraçados e por todo o apoio dado. Como não podia deixar de ser, a Rita Reis e a Denise Costa também contribuíram para esta etapa da minha vida.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer todo o apoio dado pela minha mãe e pelo meu pai, pela minha avó, pela Cristina e pelo Júlio, sempre presentes em todas as etapas da minha vida.

Resumo

Os ácidos benzoico e sórbico são os conservantes mais usados na indústria alimentar estando presentes numa grande variedade de alimentos de consumo frequente. Assim, a avaliação da ocorrência destes aditivos é essencial para garantir a segurança dos consumidores e, exige resultados precisos e fiáveis que devem ser determinados através de métodos validados.

O presente trabalho teve como objetivo a validação de um método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com base no descrito pela Norma Europeia 12856 para a determinação dos conservantes, acima mencionados, em diferentes matrizes alimentares.

Ambos os conservantes foram separados e quantificados numa coluna C18 de fase reversa usando, para tal, uma fase móvel composta por tampão fosfato (0,0125M a pH 3,5) e acetonitrilo, em eluição por gradiente, com um fluxo de 1 mL/min, e deteção na região do ultravioleta (UV) a um comprimento de onda de 220 nm.

O processo de validação consistiu na avaliação da gama de trabalho, linearidade, limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ), repetibilidade, precisão intermédia, exatidão e, no fim, quantificada a incerteza dos resultados.

O método foi aplicado na gama de concentrações de 4 . 40 µg/mL, para a qual se observou uma boa linearidade para todos os analitos ($r^2 > 0,999$).

Os resultados dos ensaios de repetibilidade e de precisão intermédia revelaram desvios padrão relativos inferiores a 5% e 7%, respetivamente, e taxas de recuperação para todos os analitos compreendidas entre os 74 e os 116%. O método revelou ser exato e os resultados obtidos estão afetados de uma incerteza de 7% para o ácido benzoico e de 8% para o ácido sórbico.

O método foi aplicado com sucesso à análise de amostras de sumos de fruta e refrigerantes, iogurtes, marmeladas, molhos emulsionados e não-emulsionados, produtos de pastelaria e de panificação. O teor de ácido sórbico e ácido benzoico nas amostras variou entre 91 . 1298 mg/kg e entre 94 - 824 mg/kg, respetivamente.

Palavras-chave: Ácido benzoico, ácido sórbico, HPLC, validação de métodos, edulcorantes intensos, géneros alimentícios.

Abstract

Food preservatives such as benzoic and sorbic acid are commonly used in food industry and are present in a wide variety of foodstuff. Therefore the assessment of their occurrence is essential to ensure the consumer safety, which requires accurate and reliable results determined by validated methods.

The work presented in this thesis aimed to the validation of a high performance liquid chromatography (HPLC) analytical method based on the procedure of European Standard 12856 for the determination of preservatives, namely, benzoic and sorbic acid in different food matrices.

Both preservatives were chromatographically separated on a reversed stationary phase C18 column. The mobile phase was constituted of phosphate buffer (pH 3.5 0,0125M) and acetonitrile in gradient elution at flow rate of 1 ml/min and UV detection at 220 nm.

The method validation process included the evaluation of the working range, linearity, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ), intra-day precision, inter-day precision, accuracy and the determination of the results uncertainties.

The method was applied in the concentration range of 4-40 µg/ml, presenting good linearity for all analytes and determination coefficients ($r^2 > 0,999$).

The intra-day RSD_i and inter-day RSD_R were less than 5% and 7%, respectively, and recovery rates for all analytes ranged from 74 to 116%. The method has proved to be accurate and the results uncertainties were 7% to benzoic acid and 8% to sorbic acid.

The validated method was successfully applied to the analysis of various samples of fruit juices and beverages, yogurts, jams, emulsified and non-emulsified sauces, bakery and pastry products. The concentration of sorbic and benzoic acid in the samples ranged from 91 - 1298 mg/kg and between 94 - 824 mg/kg, respectively.

Keywords: Benzoic acid, Sorbic acid, HPLC, method validation, intense sweeteners, foodstuffs.

Índice

| | |
|---|------|
| Agradecimentos | I |
| Resumo | III |
| Abstract..... | V |
| Índice de Figuras | VIII |
| Índice de Tabelas..... | X |
| Lista de Abreviaturas | XII |
| Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica | 1 |
| 1.1. Enquadramento do tema | 3 |
| 1.2. Aditivos Alimentares | 4 |
| 1.2.1. Regulamentação dos Aditivos Alimentares..... | 5 |
| 1.2.2. Aprovação de novos Aditivos Alimentares | 7 |
| 1.2.3. Dose Diária Admissível (DDA) | 9 |
| 1.3. Conservantes Alimentares..... | 9 |
| 1.3.1. Caracterização do Ácido Benzoico (E210)..... | 11 |
| 1.3.2. Caracterização do Ácido Sórbico (E200) | 13 |
| 1.3.3. Principais aplicações | 16 |
| 1.3.4. Mecanismos de ação..... | 16 |
| 1.3.5. Métodos para a determinação de conservantes | 18 |
| 1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência | 19 |
| 1.4.1. Fundamentos e princípios..... | 19 |
| 1.4.2. Validação de um método analítico de HPLC..... | 22 |
| Capítulo 2 - Materiais e Métodos | 33 |
| 2.1. Reagentes | 33 |
| 2.2. Preparação de soluções | 34 |
| 2.2.1. Soluções padrão stock e padrão de calibração..... | 34 |
| 2.3. Materiais e equipamentos..... | 35 |
| 2.4. Amostras | 36 |
| 2.5. Procedimento experimental | 38 |
| 2.5.1. Preparação das amostras..... | 38 |
| 2.5.2. Condições cromatográficas | 39 |
| 2.6. Identificação e quantificação do analito | 39 |
| 2.7. Processo de validação do método | 40 |
| Capítulo 3 - Apresentação e Discussão dos Resultados..... | 245 |
| 3.1. Validação do método analítico | 45 |
| 3.1.1. Especificidade e seletividade | 45 |
| 3.1.2. Validação da Gama de Trabalho | 46 |

| | | |
|--|---|-----|
| 3.1.3. | Linearidade da gama de trabalho | 48 |
| 3.1.4. | Sensibilidade | 50 |
| 3.1.5. | Limites analíticos de deteção e quantificação e Limites do método | 51 |
| 3.1.6. | Repetibilidade e linearidade do injetor | 52 |
| 3.1.7. | Precisão | 54 |
| 3.1.8. | Exatidão | 56 |
| 3.1.9. | Estimativa da incerteza dos resultados..... | 57 |
| 3.2. | Análise das amostras..... | 60 |
| 3.3. | Estabilidade das soluções padrão..... | 66 |
| Capítulo 4 - Conclusões e Trabalho futuro..... | | 73 |
| Capítulo 5 - Referências Bibliográficas | | 77 |
| ANEXOS..... | | 91 |
| ANEXO I - Folha de cálculo para determinação da humidade no padrão de aspartame..... | | 93 |
| ANEXO II - Folha de cálculo para o teste de homogeneidade das variâncias..... | | 94 |
| ANEXO III - Folha de cálculo para o teste de linearidade (Mandel)..... | | 95 |
| ANEXO IV - Folha de cálculo para a determinação da concentração do analito nos ensaios de repetibilidade | | 96 |
| ANEXO V - Folha de cálculo do desvio padrão relativo de repetibilidade (RSD _r) . | | 97 |
| ANEXO VI - Folha de cálculo do desvio padrão relativo de precisão intermédia (RSD _R)..... | | 98 |
| ANEXO VII . Resultados obtidos durante os ensaios de repetibilidade e precisão intermédia..... | | 99 |
| ANEXO VIII - Análise das Amostras (Cromatogramas)..... | | 102 |
| ANEXO IX . Folha de cálculo para determinação do teor do analito na amostra e da taxa de recuperação (%)..... | | 105 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Classificação dos aditivos alimentares consoante a função que desempenham nos alimentos [5]. | 5 |
| Figura 2 . Procedimento legislativo conducente à aprovação de um novo aditivo alimentar na UE [11]. | 8 |
| Figura 3 . Biossíntese de ácido benzoico pelas bactérias lácticas em produtos fermentados derivados do leite [30]. | 12 |
| Figura 4 . Metabolismo do ácido benzoico nos mamíferos [32]. | 13 |
| Figura 5 . Síntese industrial de ácido sórbico a partir da reação de polimerização de cetenos com crotonaldeído [35]. | 14 |

| | |
|--|-----|
| Figura 6 . Representação esquemática do modo de ação dos conservantes ácidos sórbico (RCOOH) e benzoico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$) e respetivos sais [41]. | 17 |
| Figura 7 - Esquema representativo de um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) [78]. | 20 |
| Figura 8 . Representação do procedimento de adição de padrão. | 39 |
| Figura 9 . Cromatograma da solução padrão (40 $\mu\text{g/mL}$) contendo 1 - Acessulfame-K ($t_r=6,31$ min), 2 - Sacarina ($t_r=10,69$ min), 3 - Aspartame ($t_r=29,98$ min), 4 - Cafeína ($t_r=31,25$ min), 5 - Ácido benzoico ($t_r=42,24$ min) e 6 - Ácido sórbico ($t_r=46,19$ min). | 45 |
| Figura 10 . Cromatograma de uma amostra de marmelada com Ácido Benzoico ($t_r=42,20$ min) e Ácido Sórbico ($t_r=45,82$ min). | 46 |
| Figura 11 . Cromatograma de uma amostra de marmelada sem os conservantes Ácido Benzoico e Ácido Sórbico. | 46 |
| Figura 12 . Curva de calibração (área do pico vs concentração do analito) do ácido benzoico e do ácido sórbico obtidas nos ensaios para a validação da gama de trabalho. | 49 |
| Figura 13 . Análise dos resíduos (%) nos diferentes pontos da curva de calibração. | 49 |
| Figura 14 . Representação gráfica dos valores da área do pico vs volumes de injeção da solução padrão (24 $\mu\text{g/mL}$) de ácido benzoico e ácido sórbico, para avaliação da linearidade do injetor. | 54 |
| Figura 15 . Valores de incerteza associada à precisão (em mg/kg ou mg/L) relativos aos resultados obtidos para o ácido benzoico e ácido sórbico durante os ensaios de Precisão Intermédia. (Legenda: A2, A19 e A21 . refrigerantes; A13 . iogurte; A5 e A7 . marmeladas; A14, A15, A16 e A22 . molhos emulsionados e não-emulsionados; A18 . produto de panificação e A23 . produto de pastelaria). | 59 |
| Figura 16 . Concentração (mg/kg ou mg/L) de Ácido Benzoico e Ácido Sórbico obtido na análise das amostras. | 63 |
| Figura 17 - Teor experimental (mg/kg ou mg/L) de Acessulfame-K, Aspartame, Sacarina e Cafeína obtido na análise das amostras. | 65 |
| Figura 18 . Curvas de calibração para o acessulfame-K nos ensaios de estabilidade. | 67 |
| Figura 19 - Curvas de calibração para o aspartame nos ensaios de estabilidade. | 67 |
| Figura 20 - Curvas de calibração para o ácido benzoico nos ensaios de estabilidade. | 67 |
| Figura 21 - Curvas de calibração para o ácido sórbico nos ensaios de estabilidade. | 68 |
| Figura 22 . Cromatograma da solução padrão de calibração (40 $\mu\text{g/mL}$), contendo 1 - acessulfame-K ($t_r=6,28$ min), 2 - aspartame ($t_r= 29,63$ min), 3 - ácido benzoico ($t_r= 42,29$ min) e 4 - ácido sórbico ($t_r= 45,75$ min), injetada 1 mês após a preparação. | 68 |
| Figura 23 . Cromatograma relativo a uma amostra de marmelada com ácido benzoico ($t_r=42,2$ min) e ácido sórbico ($t_r=45,8$ min). | 102 |

| | |
|--|-----|
| Figura 24 - Cromatograma relativo a uma amostra de iogurte com acessulfame-k ($t_r=6,2$ min), aspartame ($t_r=29,6$ min), ácido benzoico ($t_r=42,1$ min) e ácido sórbico ($t_r=45,8$ min)..... | 102 |
| Figura 25 - Cromatograma relativo a uma amostra de ketchup com ácido benzoico ($t_r=42,1$ min) e ácido sórbico ($t_r=45,7$ min). | 102 |
| Figura 26 - Cromatograma relativo a uma amostra de maionese com ácido sórbico ($t_r=45,6$ min)..... | 103 |
| Figura 27 - Cromatograma relativo a uma amostra de pão em fatias com ácido sórbico ($t_r=45,5$ min)..... | 103 |
| Figura 28 - Cromatograma relativo a uma amostra de bolo de pastelaria com ácido benzoico ($t_r=43,3$ min) e ácido sórbico ($t_r=46,7$ min). | 103 |
| Figura 29 - Cromatograma relativo a uma amostra de refrigerante com acessulfame-k ($t_r=6,4$ min), sacarina ($t_r=10,7$ min) aspartame ($t_r=29,9$ min), ácido benzoico ($t_r=42,4$ min) e ácido sórbico ($t_r=46,2$ min). | 104 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 . Exemplos de categorias de alguns géneros alimentícios aos quais pode ser adicionado ácido benzoico (Ab) e ácido sórbico (As), ou uma combinação destes (As+Ab) e respetivo limite máximo permitido (mg/L ou mg/kg) [20,21]..... | 10 |
| Tabela 2 . Propriedades físico-químicas do ácido benzoico e benzoato de sódio [26,28]..... | 11 |
| Tabela 3 - Propriedades físico-químicas do ácido sórbico e sorbato de potássio [35]. | 14 |
| Tabela 4 - Volumes (mL) das várias soluções padrão stock (1 mg/mL) a adicionar para preparar as soluções padrão de ensaio e respetiva concentração ($\mu\text{g/mL}$)..... | 35 |
| Tabela 5 . Descrição das matrizes analisadas e dos diferentes analitos em estudo mencionados no rótulo..... | 37 |
| Tabela 6 - Condições cromatográficas utilizadas na análise das amostras e das soluções padrão. | 39 |
| Tabela 7 . Procedimento para avaliação dos vários parâmetros de validação do método..... | 41 |
| Tabela 8 . Processo para validação da gama de trabalho..... | 47 |
| Tabela 9 . Sinal (área do pico) das dez réplicas relativas aos pontos extremos (2 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$) das gamas de trabalho em estudo e respetiva variância (S_r^2). | 47 |
| Tabela 10 . Valores de PG e da distribuição F de Snedecor/Fisher para avaliação da validade da gama de trabalho. | 48 |
| Tabela 11 . Equações das curvas de calibração para os cinco analitos a que o método foi aplicado. | 50 |

| | |
|--|----|
| Tabela 12 . Sensibilidade do método, em UA/(mg.L ⁻¹), e sua variação (%) ao longo do processo de validação do método de análise..... | 51 |
| Tabela 13 . Valores do sinal (área do pico) para as 10 injeções das soluções-padrão (4 µg/mL e 40 µg/mL) do ácido benzoico e ácido sórbico e média, desvios padrão absoluto (S) e relativo (RSD), para avaliação da repetibilidade do injetor. | 52 |
| Tabela 14 . Valores do sinal (área do pico) para a gama de volumes de injeção (10 a 200 µL) da solução-padrão (24 µg/mL) de ácido benzoico e ácido sórbico, para avaliação da linearidade do injetor. | 53 |
| Tabela 15 . Desvio padrão relativo (%) de repetibilidade (RSD _r) e precisão intermédia (RSD _R) obtidos nos ensaios de precisão para os ácidos benzoico e sórbico e acessulfame-k..... | 55 |
| Tabela 16 - Desvio padrão relativo (%) de repetibilidade (RSD _r) e precisão intermédia (RSD _R) obtidos nos ensaios de precisão para o aspartame, sacarina e cafeína. | 55 |
| Tabela 17 . Volume de solução stock adicionado à solução fortificada (mL), concentração do analito na amostra (mg/kg ou mg/L) e respectivas taxas de recuperação (%). | 56 |
| Tabela 18 . Valores da concentração experimental e teórica (em mg/kg ou mg/L), do desvio padrão e respetivo z-score, obtidos nos ensaios interlaboratoriais (03115 e 20109) regulados pelo FAPAS..... | 57 |
| Tabela 19 . Valores de incerteza padrão $u(\overline{R_m})$ (em mg/kg ou mg/L) determinados a partir dos resultados dos Ensaios FAPAS..... | 57 |
| Tabela 20 . Valores de incerteza associada à precisão, $u_{\text{precisão}}$ (mg/kg ou mg/L), com base nos resultados dos ensaios de Precisão Intermédia..... | 58 |
| Tabela 21 . Incerteza combinada expandida (%) associada à quantificação de ácido benzoico e ácido sórbico..... | 59 |
| Tabela 22 . Teor (em mg/kg ou mg/L) de ácido benzoico, ácido sórbico, aspartame, acessulfame-k, sacarina e cafeína determinados nas amostras analisadas e, volume de solução stock (1mg/mL) adicionado às amostras fortificadas para os ensaios de recuperação e respetivas taxas de recuperação..... | 60 |
| Tabela 23 - Teor (em mg/kg ou mg/L) de ácido benzoico, ácido sórbico, aspartame, acessulfame-k, determinados nas amostras analisadas e, volume de solução stock (1mg/mL) adicionado às amostras fortificadas para os ensaios de recuperação e respetivas taxas de recuperação (<i>continuação</i>). | 62 |
| Tabela 24 - Desvio percentual das soluções padrão "de estabilidade" relativamente às soluções padrão "frescas"..... | 69 |
| Tabela 25 . Valores das áreas dos picos cromatográficos relativamente à quantificação dos analitos (acessulfame-K, aspartame, ácido benzoico e ácido sórbico) na solução padrão de calibração (40 µg/mL) e resultados do teste-t emparelhado (p <0,05). | 70 |
| Tabela 26 . Concentração corrigida do aspartame (µg/mL) nas soluções padrão de calibração. | 93 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 27 - Concentração corrigida das soluções padrão de calibração de aspartame (µg/mL)..... | 93 |
| Tabela 28 . Concentração (média ± desvio padrão) de cada analito para as amostras de refrigerantes analisadas nos ensaios de repetibilidade e precisão intermédia. | 99 |
| Tabela 29 - Concentração (média ± desvio padrão) de cada analito para as amostras de iogurtes e marmeladas analisadas nos ensaios de repetibilidade e precisão intermédia..... | 100 |
| Tabela 30 - Concentração (média ± desvio padrão) de cada analito para as amostras de molhos, produtos de pastelaria e panificação, analisadas nos ensaios de repetibilidade e precisão intermédia..... | 101 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|---------|--|
| ATP | Trifosfato de Adenosina |
| CAC | Codex Alimentarius Commission |
| CCFAC | Codex Committee on Food Additives and Contaminants / Comité do Codex Alimentarius sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes |
| CE | Comissão Europeia |
| DDA | Dose Diária Admissível |
| EFSA | European Food Safety Authority / Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar |
| EI | Ensaio Interlaboratorial |
| EN | European Norm / Norma Europeia |
| FAO | Food and Agriculture Organization / Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação |
| FAPAS | Food Analysis Performance Assessment Scheme |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FIA | Flow Injection Analysis |
| FPIA | Imunoensaio por Fluorescência Polarizada |
| GRAS | Generally Recognized as Safe |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| ICH | International Conference of Harmonization |
| IRMM | Institute for Reference Materials and Measurements |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| JEFCA | Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives / Comité Misto de Peritos da FAO/OMS em aditivos alimentares |
| LOD | Limite of Detection / Limite de Detecção |
| LOQ | Limit of quantification / Limite de Quantificação |
| MRC | Materiais de Referência Certificados |
| NIST | National Institute of Standards and Technology |
| NOAEL | No Observed Adverse Effect Level / Nível de Efeito Adverso não Observado |
| RP-HPLC | Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa |
| RSD | Desvio padrão relativo |
| SFC | Scientific Food Committee / Comité Científico da alimentação Humana |
| USDA | United States Department of Agriculture |
| UE | União Europeia |
| WHO | World Health Organization / Organização Mundial de Saúde |

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Projeto MONITADITIVOS, no Laboratório de Química do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, I.P.) e consistiu na Validação de um Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), descrito pela Norma EN 12856 e sua posterior aplicação a diferentes produtos alimentares disponíveis no mercado nacional para análise do teor de conservantes e de alguns edulcorantes intensos.

1.1. Enquadramento do tema

Hoje em dia como a produção e distribuição dos alimentos está cada vez mais globalizada o risco da disseminação de doenças relacionadas com a presença de agentes patogénicos químicos ou microbiológicos nos alimentos pode ser elevada. Neste contexto garantir a segurança alimentar dos consumidores é cada vez mais importante na sociedade, tornando-se imprescindível para o Homem armazenar, tratar e acondicionar os géneros alimentícios de forma adequada [1].

Os aditivos alimentares são de grande utilidade nesses processos mas têm sido muitas vezes alvo de discussão entre os consumidores que os associam a produtos químicos nocivos presentes nos alimentos [2].

Por ser uma questão polémica e de modo a garantir a segurança do consumidor, a legislação europeia exige uma revisão periódica dos estudos apresentados no processo de aprovação de aditivos para avaliar qualquer alteração no padrão de consumo alimentar e, assim efetuar alterações, por exemplo, ao nível, da Dose Diária Admissível [1].

De entre as várias classes de aditivos, os conservantes como o ácido benzoico e ácido sórbico e os seus respetivos sais, estão presentes em praticamente todo o tipo de alimentos industrialmente processados que fazem parte da nossa dieta.

De forma a concretizar a realização de estudos de avaliação da exposição aos conservantes é essencial o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos robustos e sensíveis, capazes de determinar a presença e a quantidade destas espécies no maior número possível de matrizes alimentares. Assim, é possível controlar o cumprimento da legislação pelos produtores [3].

1.2. Aditivos Alimentares

Desde os tempos remotos que várias substâncias químicas são adicionadas aos alimentos para desempenhar determinadas funções [4]. Embora os aditivos alimentares sejam parte integrante da indústria alimentar moderna, desde há séculos que o Homem se preocupa com a preservação dos alimentos, nomeadamente, através da utilização de vinagre para preservar legumes e do uso de sal para preservar carne e peixe [5].

Desde o século XIX, são utilizadas outras substâncias químicas, não só para conservar, mas também para conferir características que tornem os alimentos mais agradáveis, como é o caso da cor, do sabor ou da sua textura [1].

A União Europeia (UE) na Diretiva 89/107/CEE define **aditivo alimentar** como qualquer substância não consumida habitualmente como alimento em si mesmo e habitualmente não utilizada como ingrediente característico na alimentação, com ou sem valor nutritivo, e cuja adição intencional aos géneros alimentícios, com um objetivo tecnológico, na fase de fabrico, transformação, preparação, tratamento, e condicionamento, transporte ou armazenagem, tenha por efeito, que ela própria ou os seus derivados se tornem direta ou indiretamente um componente desses géneros alimentícios [1,5,6]. De realçar que qualquer substância adicionada sem intenção, como é o caso dos agroquímicos nas culturas [7], ou dos adjuvantes tecnológicos [6], não está incluída na definição de aditivo alimentar.

Diferentes tipos de aditivos são usados para diferentes propósitos, embora muitos deles desempenhem, individualmente, mais do que uma função. Para fins de classificação e regulação, estas substâncias foram agrupadas consoante a sua função primária (**Figura 1**) em: conservantes, corantes, antioxidantes, edulcorantes, emulsionantes, estabilizadores, espessantes e gelificantes, e outros aditivos (intensificadores de sabor, acidificantes, reguladores de acidez, antiaglomerantes, amidos modificados, levedantes, antiespumas, agentes de revestimento, agentes de endurecimento, humidificantes, sequestrantes, agentes de tratamento de farinha, propulsores, gases de embalagem e enzimas) [6,8].

De forma a garantir a confiança dos consumidores e de harmonizar as normas da indústria alimentar em todo o espaço da UE foi criado um sistema de identificação sendo atribuído a cada aditivo um número de três ou quatro algarismos precedidos pela letra **E**, para evidenciar que o mesmo foi considerado seguro e autorizado pelo Comité Científico dos Alimentos (Scientific Committee on Food - SFC) do Conselho Europeu, mais tarde substituído pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (European Food Safety Authority - EFSA), e a sua inclusão na respetiva diretiva

tenha sido aprovada pelos vários Estados Membros [8,9,10]. Este sistema E-número+ permite caracterizar os vários aditivos consoante a sua função (**Figura 1**), sendo uma maneira simples de os referir nos rótulos dos produtos alimentares por toda a UE ultrapassando as barreiras linguísticas [2].

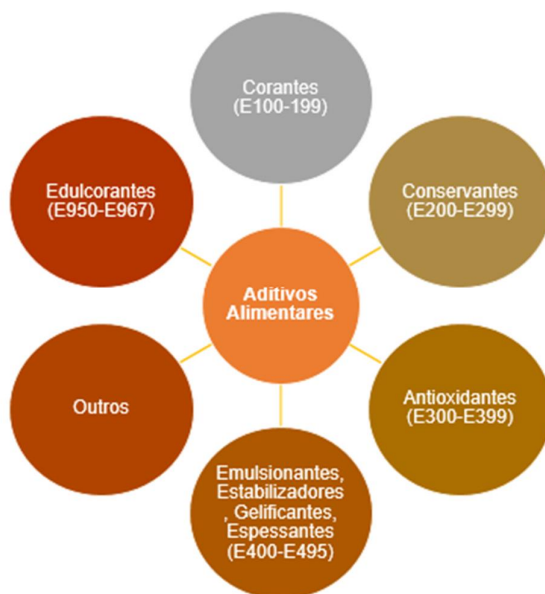


Figura 1 - Classificação dos aditivos alimentares consoante a função que desempenham nos alimentos [5].

1.2.1. Regulamentação dos Aditivos Alimentares

Cada um dos Estados Membros da UE teve, durante muitos anos, a sua própria legislação em matéria de aditivos alimentares o que dificultava as trocas comerciais com outros países. No entanto, este paradigma mudou e acredita-se que um mercado único de bens alimentares e a sua livre circulação pode promover o desenvolvimento económico. Desta forma, tornou-se essencial a harmonização da legislação em todo o espaço europeu [9].

Desde 1988, a UE através de avaliações de riscos efetuadas pelo SFC e atualmente pela EFSA, tem harmonizado a legislação nacional dos Estados Membros através da Diretiva 89/107/CEE, alterada pela Diretiva 94/34/CE, que regulamenta os aditivos alimentares que podem ser utilizados nos géneros alimentícios destinados ao consumo humano, bem como os princípios gerais que regulam o processo de autorização de novas substâncias na UE [8,9,11]. Esta diretiva-quadro é complementada com outras três diretivas adotadas pelo Parlamento Europeu e pelo

Conselho Europeu, em 1995, relativas aos edulcorantes (Diretiva 94/35/CE), corantes (Diretiva 94/36/CE), e restantes aditivos (Diretiva 95/2/CE, alterada pelas Diretivas 98/72/CE, 2001/5/CE, 2003/52/CE, 2003/114/CE e 2010/69/UE), onde são definidas listas dos aditivos autorizados (com a exclusão de outros) e referidos alimentos nos quais podem ser utilizados e os limites máximos permitidos [2]. Existem ainda diretivas específicas (Diretivas 95/31/CE para os edulcorantes, 95/45/CE para os corantes e 96/77/CE, alterada pelas Diretivas 2008/84/CE e 2010/67/UE, para os restantes aditivos) que estabelecem critérios de pureza para os aditivos autorizados [1,12].

Em Portugal, a utilização de aditivos em géneros alimentícios encontra-se regulada pelo Decreto-Lei nº 192/98 de 8 de Maio, que resultou da transposição da Diretiva 89/107/CE, o qual foi recentemente alterado pelo Decreto-Lei nº64/2011 de 9 de Maio. Por sua vez, os critérios de pureza estabelecidos pela Diretiva 96/77/CE foram transpostos para o Decreto-Lei nº365/98, de 21 de Novembro, também alterado pelo Decreto-Lei nº 64/2011 [12].

É importante salientar que os aditivos alimentares são o único domínio técnico onde a aprovação com vista à utilização de uma substância requer um procedimento de codecisão, o que torna a gestão das aprovações morosa e complicada [13].

No processo de regulamentação de aditivos alimentares, todos os países devem ter acesso a avaliações fidedignas sobre os riscos associados à sua utilização, mas poucos têm capacidade técnica e meios económicos para efetuarem estas avaliações.

Sendo assim, é muito importante o trabalho realizado por agências internacionais criadas conjuntamente pela Organização Mundial de Saúde (World Health Organization . WHO) e pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization . FAO) como o Comité Misto de Peritos da FAO/OMS em aditivos alimentares (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JEFCA) e Comité do Codex Alimentarius sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes (*Codex Committee on Food Additives and Contaminants* - CCFAC), que se dedicam a estudar os aditivos com o objetivo de estabelecer regulamentação internacional. O JEFCA atua como um conselheiro científico para a FAO e OMS e para a *Comissão do Codex Alimentarius* (Codex Alimentarius Commission - CAC), e estabelece as linhas de orientação para avaliar a segurança dos aditivos, realizar avaliações toxicológicas, determinar a Dose Diária Admissível (DDA) de cada aditivo, preparar as suas especificações de pureza e avaliar a frequência do consumo de alimentos com aditivos. O CCFAC, por sua vez, aconselha o CAC sobre aditivos alimentares, contaminantes e outras substâncias tóxicas naturalmente presentes, examinando a pureza e as características dos aditivos, estabelecendo o limite máximo de contaminantes e indicando quais os

alimentos a que podem ser adicionados aditivos e qual a quantidade máxima que pode ser adicionada [5,8,11].

Nos Estados Unidos, a regulação dos aditivos recai sobre a *Food and Drug Administration* (FDA) e sobre o Departamento da Agricultura (*United States Department of Agriculture* - USDA). Como resposta ao uso generalizado de muitas substâncias não aprovadas pela FDA, em 1958 foi criada a ~~%~~lista GRAS+ (*Generally Recognized As Safe*), que compreende as substâncias reconhecidas por unanimidade como sendo seguras. Esta lista equivale à ~~%~~lista positiva+ da legislação Europeia (primeira regulação europeia sobre aditivos alimentares) onde são discriminados todas as substâncias permitidas, as quais foram cientificamente comprovadas como sendo inócuas para os seres humanos [11].

Além dos rigorosos critérios aplicados na avaliação de risco, os regulamentos também exigem que os aditivos apareçam nos rótulos das embalagens dos alimentos e bebidas onde estão presentes, com exceção dos casos em que tenha sido cientificamente demonstrado que, em condições específicas, não são suscetíveis de provocar reações indesejáveis, sendo a sua inclusão no rótulo facultativa. Nos rótulos deve, ainda, estar discriminado o nome ou número do aditivo e qual a sua função no produto [11].

De referir ainda que segundo o Regulamento 1169/2011 da UE, a partir de 2014, os produtores e distribuidores que queiram vender produtos alimentares *online* terão que disponibilizar ao consumidor uma informação completa sobre os géneros alimentícios que comercializam [14].

1.2.2. Aprovação de novos Aditivos Alimentares

Como a inclusão de novos aditivos alimentares no espaço europeu pode ser proposta pela UE ou por um dos seus Estados Membros, a UE estabeleceu uma estrutura legislativa (**Figura 2**) conducente à autorização destas substâncias. Esta autorização requer uma avaliação de segurança pelo SFC/EFSA que avalia a informação providenciada pelo produtor em relação ao novo aditivo, incluindo dados toxicológicos e respectiva função, bem como outras informações relevantes para o processo. No caso de o aditivo preencher os requisitos de segurança, o SFC/EFSA estabelece a sua DDA e a Comissão Europeia (*European Commission* . EC) desenvolve uma legislação baseada nos pareceres do comité e apresenta-a ao Conselho Europeu e ao Parlamento Europeu. A aprovação é promulgada numa Diretiva Comunitária Europeia que obriga cada Estado Membro a efetuar as alterações necessárias na legislação nacional de forma a incluir o novo aditivo.

Alternativamente, o produtor pode pedir ao respetivo Estado Membro uma autorização nacional provisória enquanto a UE delibera sobre a legalização do aditivo. Neste caso, um comité de peritos do Estado Membro avalia o pedido, seguindo procedimentos semelhantes aos usados pelo SFC. Se o Estado membro estabelecer a DDA, o aditivo pode ser aprovado para uso nesse país por um período de 2 anos, enquanto o pedido de autorização é estudado na UE. Se o aditivo vier a ser autorizado pelo SCF será objeto de uma Diretiva Europeia. Caso contrário o aditivo será banido de todos os Estados Membros [11].

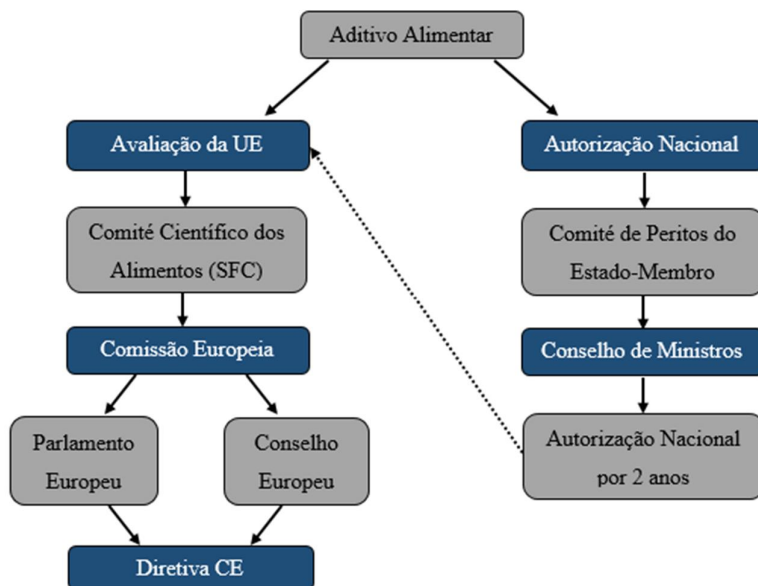


Figura 2 É Procedimento legislativo conducente à aprovação de um novo aditivo alimentar na UE [11].

Depois da inclusão do novo aditivo no mercado, cabe às agências reguladoras monitorizar e realizar revisões regulares à segurança da substância em questão, em resposta a novos pareceres científicos de relevo [3].

No que se refere à aprovação de aditivos alimentares nos Estados Unidos, o pedido de autorização é apresentado à FDA. O processo deve incluir informação pertinente sobre a toxicidade do aditivo baseado em testes toxicológicos em animais ou até mesmo em humanos. Para avaliar se um aditivo deve ou não ser aprovado, a agência considera a composição e os atributos da substância, a quantidade provável em que é ingerida, os possíveis efeitos a longo prazo para o consumidor e outras características de segurança. Se o aditivo for aprovado, a FDA publica uma nova regulamentação onde são incluídos os tipos de alimentos aos quais se pode adicionar o aditivo em questão, a quantidade máxima que pode ser adicionada e a forma como deve estar identificado nos rótulos dos produtos [11].

1.2.3. Dose Diária Admissível (DDA)

A presença de um ou mais aditivos, em quantidades variáveis, pode desempenhar diversas funções nos alimentos, desde melhorar a qualidade nutricional dos produtos, promover a sua segurança durante o prazo de validade, facilitar o processamento e, por vezes, conferir características aos produtos que os tornem desejáveis para o consumidor. Em suma, o uso de aditivos traz, aparentemente, benefícios quer para o produtor quer para o consumidor [5].

No entanto, como foi abordado nos subcapítulos 1.2.1 e 1.2.2 são realizados inúmeros testes para avaliar a toxicidade dos aditivos com base nos quais as autoridades reguladoras, como o JEFCA, desenvolveu o conceito de Dose Diária Admissível (DDA) para garantir a segurança dos consumidores [2].

A DDA representa a quantidade estimada de, por exemplo, um aditivo que pode ser consumida diariamente durante toda a vida, sem quaisquer repercussões para a saúde humana. Este valor é expresso em miligrama de aditivo por quilograma de peso corporal por dia [1].

A definição da DDA envolve a análise dos resultados dos testes toxicológicos e tem por base a determinação da dose máxima que pode ser administrada e que não apresenta efeitos tóxicos, *%nível de efeito adverso não observado+ (No observed adverse effect level - NOAEL)*, para os animais que foram objeto de estudo [1,2,3].

Devido à margem de segurança utilizada na determinação da DDA, a ocorrência de reações adversas só é provável caso o consumo do aditivo em causa ultrapasse o valor da DDA por longos períodos de tempo [2].

1.3. Conservantes Alimentares

Segundo a Diretiva Comunitária 95/2/CE, o termo *%conservante+* diz respeito a *%todas as substâncias que prolongam a durabilidade dos géneros alimentícios contra a deterioração causada por microrganismos+, diferente da definição de %antioxidante+ que considera %todas as substâncias que prolongam a durabilidade dos géneros alimentícios, protegendo-os contra a deterioração causada pela oxidação, tal como a rancidez das gorduras e as alterações de cor [15].*

Nos últimos anos, a indústria alimentar tem-se deparado com um desafio crescente no que toca à conservação dos alimentos. Se por um lado existem restrições impostas pela legislação relativa ao uso de aditivos e consumidores cada

vez mais exigentes, que desejam produtos de elevada qualidade e sem aditivos, por outro lado aumenta a procura por alimentos processados e pré-cozinhados cuja conservação requer a utilização de aditivos [16-18].

Com efeito, a adição de agentes químicos como o ácido benzoico e o ácido sórbico, e respetivos sais de sódio e potássio, é o método mais frequentemente usado pela indústria para evitar a deterioração dos alimentos. Estes conservantes são considerados como agentes antimicrobianos, pois inibem ou retardam o crescimento de bactérias, fungos e bolores [19].

De facto, é comum encontrar estes dois aditivos nos rótulos de diversos géneros alimentícios tais como, sumos, refrigerantes, marmeladas, molhos emulsionados (ex: maionese) e não emulsionados (ex: ketchup), produtos de pastelaria, pão em fatias, entre outros. Consoante o tipo de alimento, a UE estabeleceu na Diretiva Europeia 95/2/CE os limites máximos permitidos para cada conservante (**Tabela 1**).

Tabela 1 Exemplos de categorias de alguns géneros alimentícios aos quais pode ser adicionado ácido benzoico (Ab) e ácido sórbico (As), ou uma combinação destes (As+Ab) e respetivo limite máximo permitido (mg/L ou mg/kg) [20,21].

| Género Alimentício | Limite máximo permitido | | | Exemplo |
|---|-------------------------|----------------|-------------------------|-----------------------------------|
| | Ácido Sórbico | Ácido Benzoico | As+Ab | |
| Bebidas aromatizadas não alcoólicas | 300 mg/L | 150 mg/L | 250+150 mg/L | Sumos |
| Marmelada | - | - | 1500 mg/kg | Marmeladas |
| Pão pré embalado em fatias e pão de centeio | 2000 mg/kg | - | - | Pão em fatias |
| Molhos emulsionados com menos de 60% de matéria gorda | 2000 mg/kg | - | - | Maionese light, Margarina líquida |
| Molhos não emulsionados | - | - | 1000 mg/kg | Ketchup |
| Produtos de confeitaria (exceto chocolate) | - | - | 1500 mg/kg ¹ | Bolos para venda a retalho |
| Sobremesas à base de produtos lácteos, incluindo os produtos lácteos aromatizados, fermentados com fermentos vivos, não submetidos a tratamento térmico | - | - | 300 mg/L ou (mg/kg) | logurtes |

¹ no Decreto-lei 363/98 está declarado um teor máximo de 1500 mg/kg para a combinação de benzoatos, sorbatos e p-hidroxibenzoatos (PHB), do qual 300 mg/kg, no máximo, dizem respeito ao PHB.

Dada a relutância dos consumidores quanto ao consumo de alimentos com aditivos e o aparecimento de novos agentes patogénicos, ou de estirpes resistentes, nos alimentos tornou necessário o desenvolvimento de métodos inovadores como, por

exemplo, a incorporação de conservantes nas chamadas embalagens ativas, para garantir a estabilidade e segurança do produto durante o seu prazo de validade sem ser necessário a sua incorporação no produto [22-24].

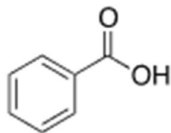
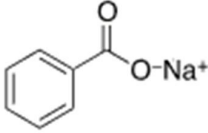
1.3.1. Caracterização do Ácido Benzoico (E210)

O ácido benzoico foi, em 1908, o primeiro conservante a receber aprovação por parte da FDA para utilização na indústria alimentar. Características como o baixo custo de produção, fácil incorporação nos alimentos, baixa toxicidade e o facto de ser incolor tornaram este composto num dos conservantes mais utilizados em todo o mundo. Igualmente, os seus respetivos sais de sódio, potássio e cálcio, designados por benzoatos são, também, usados com frequência nos alimentos [25].

Este conservante demonstrou ter propriedades antibacterianas (bacteriostático e bactericida) e antifúngicas (fungistático e fungicida) sendo capaz de inibir o crescimento de bactérias, fungos e leveduras, a valores baixos de pH o que torna adequada a sua utilização e dos seus sais, em alimentos ácidos (pH 4,5) como sumos de fruta, refrigerantes, molhos, pickles, cremes de pastelaria, conservas, azeitonas [23,25-29]. Alternativamente, o ácido benzoico é usado como intermediário na síntese de fenol e de ϵ -caprolactama, e como conservante na indústria farmacêutica (ex: produtos dermatológicos) e na cosmética [26].

Na **Tabela 2**, encontram-se descritas algumas das principais propriedades físico-químicas do ácido benzoico e do benzoato de sódio.

Tabela 2 Propriedades físico-químicas do ácido benzoico e benzoato de sódio [26,28].

| Propriedade | Ácido Benzoico | Benzoato de Sódio |
|---|---|--|
| Estrutura Química |  |  |
| Número CAS | 65-85-0 | 532-32-1 |
| Fórmula Molecular | $C_6H_5CO_2H$ | $C_6H_5CO_2Na$ |
| Peso Molecular (g/mol) | 122,13 | 144,11 |
| Massa volúmica (g/cm ³ , a 24°C) | 1,311 | 1,497-1,527 |
| pK_a (a 25°C) | 4,19 | - |
| Descrição | Pó branco e cristalino | Pó branco e cristalino |
| Solubilidade (H ₂ O, a 20°C) | 2,9 g/L | 550-630 g/L |
| Odor | Inodoro | Inodoro |

Existem diversos mecanismos para a síntese do ácido benzoico embora, industrialmente este seja sintetizado através da oxidação em fase líquida do tolueno [26].

Na natureza, o ácido benzoico ocorre não só em várias plantas como um metabolito mas, também em vários frutos como mirtilos, uvas, morangos, tomates, maçãs, em algumas especiarias como a canela e o cravinho, no mel, em algumas espécies de cogumelos e chás [25,26]. Verificou-se ainda a sua ocorrência em alguns produtos derivados do leite como subproduto da degradação microbiana do ácido hipúrico ou da fenilalanina presente nestes produtos ou por oxidação do benzaldeído, durante a etapa de fermentação (**Figura 3**) [25]. A concentração desta substância nos laticínios não excede os 40 mg/kg de produto [26].

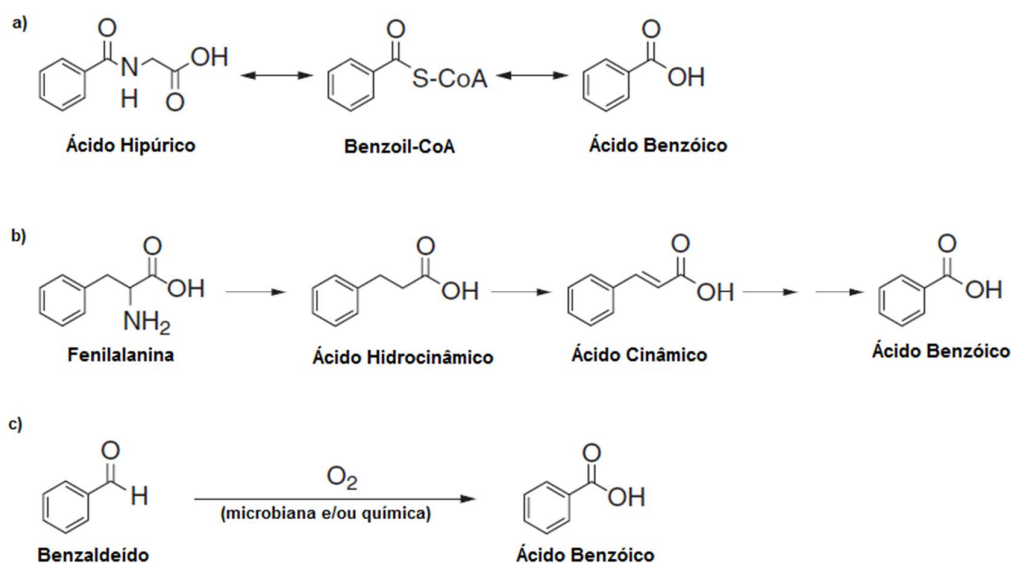


Figura 3 É Biossíntese de ácido benzoico pelas bactérias lácticas em produtos fermentados derivados do leite [30].

Em conjunto com o ácido benzoico, também os benzoatos foram aprovados pela FDA e EFSA como sendo seguros para utilização nos alimentos, no entanto, devido à maior solubilidade do benzoato de sódio em água (aproximadamente 200x mais solúvel que o ácido) este é preferencialmente usado como conservante [26]. Embora a forma não dissociada do ácido benzoico seja um agente antimicrobiano mais eficiente, o sal de sódio é mais eficaz para uma gama de pH de 2,5 a 4 sendo, portanto, a forma mais adequada de ser utilizada como conservante [23]. Adicionalmente, alguns estudos demonstraram que a combinação deste conservante e de ácido ascórbico (vitamina C), ambos presentes em sumos e refrigerantes, pode levar à formação de benzeno, uma substância cancerígena [25,29,31].

Por vezes, é utilizada uma combinação do benzoato de sódio com outros conservantes, por exemplo, o sorbato de potássio (sal do ácido sórbico), dióxido de enxofre, parabenos (p-hidroxibenzoatos), dióxido de carbono, devido aos efeitos sinérgicos que são criados o que possibilita um maior espectro de ação ou uma maior atividade antimicrobiana [25].

Do ponto de vista toxicológico, foram feitos inúmeros estudos em diversas classes de animais (ratos, gatos, coelhos, cães) e em humanos onde foi constatada a baixa toxicidade quer do ácido benzoico quer do benzoato de sódio [25,26]. Verificou-se que após a ingestão oral, este conservante é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, onde é ativado e, é posteriormente metabolizado no fígado, por conjugação à glicina, levando à formação de ácido hipúrico, o qual é rapidamente excretado através da urina (**Figura 4**). Esta via é responsável por remover entre 66 a 95% do ácido benzoico ingerido, evitando a sua bioacumulação no organismo [25]. Ainda assim, sabe-se que estas substâncias podem causar reações de pseudo-alergias (não imunológicas) em pacientes mais sensíveis [26].

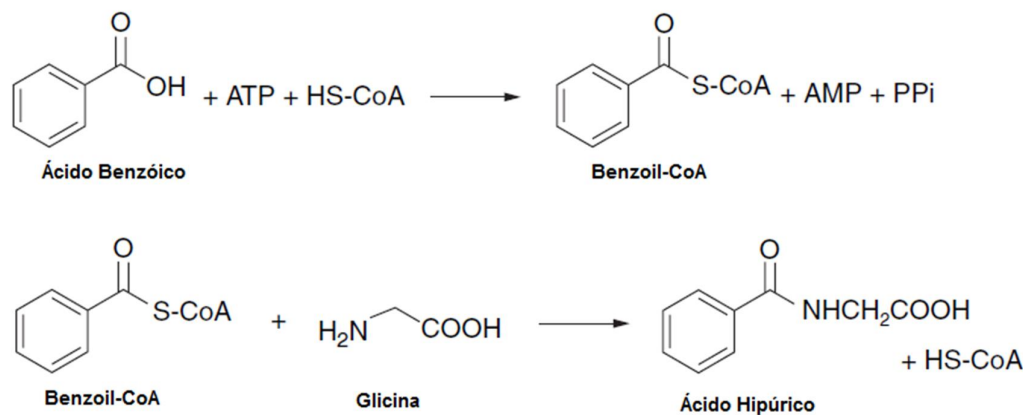


Figura 4 É Metabolismo do ácido benzoico nos mamíferos [32].

Deste modo, o JEFCA definiu uma DDA de 0 a 5 mg/kg de peso corporal/dia para o ácido benzoico e benzoatos [25,26,29,33].

1.3.2. Caracterização do Ácido Sórbico (E200)

O ácido sórbico foi isolado pela primeira vez, em 1859, do óleo das bagas da árvore *Sorbus aucuparia* (também conhecida por *Mountain ash tree*) pelo químico alemão A. W. von Hoffmann, embora, as suas propriedades antimicrobianas só tenham sido descobertas na década de 1930 por E. Miller e C. M. Gooding [23,34].

Atualmente, o ácido sórbico e os sorbatos, em especial o sorbato de potássio, são bastante usados como agentes antimicóticos (ou fungicidas), inclusive para fungos produtores de micotoxinas [23] e, nas carnes, como inibidor da bactéria *Clostridium botulinum* responsável pela doença do botulismo, atuando como substituto dos nitritos dos quais podem resultar, substâncias cancerígenas [34].

Ao longo dos anos foram desenvolvidas várias reações de síntese do ácido sórbico, no entanto, estes processos apresentavam alguns inconvenientes como a formação de produtos secundários instáveis ou a existência de baixos rendimentos.

Atualmente, este conservante é produzido industrialmente, através de uma reação de polimerização entre cetenos e crotonaldeído (ou 2-butenal), da qual resulta um poliéster do ácido 3-hidroxi-4-hexenóico que é posteriormente clivado com ácido clorídrico, tal como se pode observar na **Figura 5**.

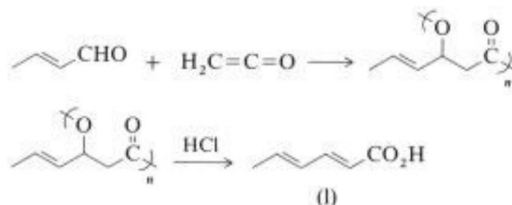


Figura 5 É Síntese industrial de ácido sórbico a partir da reação de polimerização de cetenos com crotonaldeído [35].

Na tabela seguinte, encontram-se descritas algumas das principais propriedades físico-químicas do ácido sórbico e do sorbato de potássio.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas do ácido sórbico e sorbato de potássio [35].

| Propriedade | Ácido Sórbico | Sorbato de Potássio |
|---|---|---|
| Estrutura Química | | |
| Número CAS | 22500-92-1 | 24634-61-5 |
| Fórmula Molecular | C ₅ H ₇ CO ₂ H | C ₅ H ₇ CO ₂ K |
| Peso Molecular (g/mol) | 112,13 | 150,22 |
| Massa volúmica (g/cm ³ , a 20°C) | 1,204 | 1,36 |
| pK _a (a 25°C) | 4,76 | - |
| Aparência | Pó branco e cristalino | Pó branco e cristalino |
| Solubilidade (H ₂ O, a 20°C) | 1,6 g/L | 1400 g/L |
| Odor | Inodoro | Inodoro |

Comparativamente ao ácido benzoico, também, a forma não dissociada do ácido sórbico é responsável pela atividade antimicrobiana sendo, esta mais preponderante para bolores e leveduras e mais seletiva para bactérias e, para uma maior gama de pH (pH 6,5). No entanto, sob determinadas condições tais como o tipo e a estirpe de microrganismo, as propriedades do substrato (i.e., o alimento), o pH, a atividade da água a_w , a temperatura de armazenamento, a atividade do conservante pode variar. Observou-se alguns casos de resistência de leveduras como a *Candida spp.* e a *Saccharomyces spp.* à ação do ácido sórbico e até à sua metabolização [34].

Atualmente, existem no mercado substâncias derivadas do ácido sórbico, alternativas aos sorbatos, que demonstram maior ação antimicótica como, por exemplo, a sorbamida que mostrou ser 1000x mais eficiente que o ácido que lhe deu origem, ou que são ativos para uma maior gama de pH como se verifica no ácido sorbohidroxâmico (ácido 2,4-hexadienohidroxâmico) capaz de inibir o crescimento de bolores para valores de pH entre 3,6 e 9,2 [34].

Em termos toxicológicos, o ácido sórbico surge como um dos conservantes que menos efeitos indesejáveis causa ao consumidor [23]. Vários estudos realizados para avaliar a toxicidade desta substância demonstraram que este ácido gordo insaturado é metabolizado através do ciclo da β -oxidação dos ácidos gordos, de forma semelhante ao que se verifica para os ácidos gordos de origem natural. Assim, a baixa toxicidade observada deve-se à degradação do conservante através de vias metabólicas naturais do nosso organismo [36,37].

Adicionalmente, alguns estudos reportaram a ocorrência de interações entre o ácido sórbico e outros aditivos como, por exemplo, os nitritos presentes em carnes fumadas podem dar origem a substâncias mutagénicas, ou a ocorrência de reações de acastanhamento por um mecanismo não enzimático resultante da interação do conservante com compostos aminados, como a lisina e o glutamato [34].

Tal como se verificou para o ácido benzoico foi, também, observado para o ácido sórbico algumas reações pseudo-alérgicas nomeadamente, irritação cutânea em indivíduos com elevada sensibilidade [37].

Características do ácido sórbico e dos sorbatos tais como, a menor toxicidade e um menor efeito nas propriedades organoléticas dos alimentos, face ao ácido benzoico e benzoatos, tornou possível a sua aplicação em praticamente quase todo o tipo de alimentos tais como, refrigerantes e sumos de fruta [38-40], emulsões (margarina, maionese), produtos de panificação, compotas, vinho, entre outros e, nos produtos cosméticos e farmacêuticos [34].

Deste modo, a maior segurança deste agente antimicrobiano permitiu o estabelecimento de uma DDA, fixada pelo JEFCA, de 0 a 25 mg/kg de peso corporal/dia [40].

1.3.3. Principais aplicações

Tal como foi referido no subcapítulo anterior, a atividade antimicrobiana do **ácido sórbico** contra bolores e leveduras e a menor toxicidade face ao **ácido benzoico**, tornou-o um dos conservantes mais usados em todo o mundo.

Consoante o tipo de alimento, o processo de adição do conservante varia, podendo ser adicionado diretamente ao produto, pulverizado sobre a forma de um *spray* contra a superfície do alimento, imergindo o produto numa solução do agente antimicrobiano ou, incorporando o aditivo na embalagem de armazenamento do alimento [23,34].

A conservação do queijo é uma das principais aplicações do ácido sórbico. Neste caso, o conservante é frequentemente pulverizado contra a superfície do queijo onde o bolor se desenvolve. Contudo, o processo de adição do conservante pode mudar, dependendo do tipo de queijo em questão [34].

Produtos como frutos secos e preparados de fruta com elevado teor em açúcar (ex: marmeladas) podem conter pequenas quantidades de ácido sórbico uma vez que se desenvolvem efeitos sinérgicos em ambientes de humidade reduzida e com grandes concentrações de açúcar [34].

No caso dos sumos de fruta, os sorbatos são bastante usados por não alterarem as propriedades organoléticas, sendo adicionados numa etapa de pré-tratamento, em conjunto com dióxido de enxofre e, posterior pasteurização, com o objetivo de inibir a degradação química, enzimática ou microbiológica. O sorbato de sódio tem aplicação no campo dos vinhos para prevenir posteriores processos de fermentação [23,34].

Uma outra aplicação do ácido sórbico é em produtos de panificação apresentando vantagens em relação ao ácido propiónico, pela sua ação a valores superiores de pH e capacidade em inibir a produção de aflatoxinas em bolores [34].

1.3.4. Mecanismos de ação

Existem diversos fatores que influenciam a eficiência destes ácidos orgânicos enquanto agentes antimicrobianos. Grande parte dos estudos realizados concluíram que a atividade destes conservantes depende fortemente do pH [23].

Os mecanismos de ação dos ácidos sórbico e benzoico na inibição do crescimento de microrganismos têm sido extensivamente estudados, embora não sejam totalmente conhecidos.

De uma maneira geral, os ácidos fracos como é o caso do ácido sórbico e do ácido benzoico, quando em solução, existem sob a forma de um equilíbrio dependente do pH. Estes conservantes, tal como foi dito anteriormente, possuem maior atividade para baixos valores de pH, onde é favorecida a forma neutra. Neste estado, a molécula é capaz de atravessar a membrana plasmática, permeável, e, entrar na célula microbiana [23].

Uma vez no citoplasma (**Figura 6**), o equilíbrio é deslocado devido ao maior pH do ambiente intracelular resultando na dissociação da molécula em iões carregados negativamente (RCOO^-) e positivamente (H^+), aos quais a membrana plasmática é impermeável [16]. A acumulação de protões no interior da célula vai resultar na ativação de mecanismos de homeostase, naturais aos microrganismos, para manter o pH a valores próximos da neutralidade. A expulsão dos protões para o exterior, ocorre por mecanismos que utilizam ATP (adenosina trifosfato) daí que um fluxo contínuo de catiões proveniente da utilização de elevadas concentrações do conservante vai resultar na depleção de energia pela célula [16,23,41].

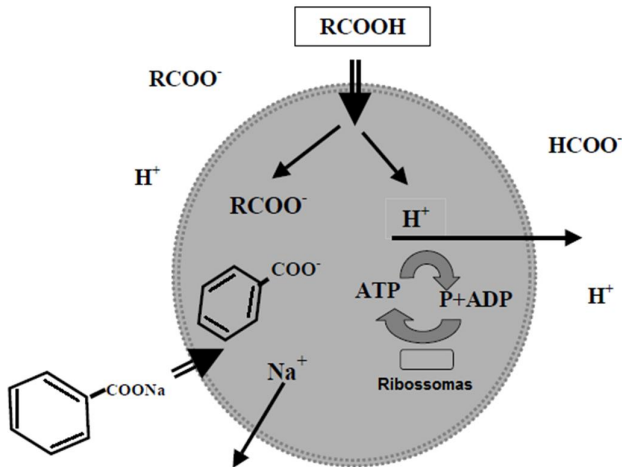


Figura 6 É Representação esquemática do modo de ação dos conservantes ácidos sórbico (RCOOH) e benzoico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$) e respetivos sais [41].

Adicionalmente, um estudo realizado por Sheu & Freese (1972) mostrou que a estrutura destes ácidos pode provocar alterações estruturais na membrana celular que interferem com a regeneração de ATP na célula ou até na captação de metabolitos para o seu interior [23].

Salmond *et al.*, 1984, estudou o efeito dos conservantes no mecanismo de homeostase do pH na *Escherichia coli*. Os autores propuseram que o grau de inibição através do ácido benzoico depende especificamente da concentração do ácido na forma não-dissociada, através na inativação de vias metabólicas, em vez de acidificação do citoplasma causada pela dissociação do ácido. No entanto, segundo estes autores, destes dois processos resulta um efeito sinérgico [42].

Outros estudos realizados com benzoatos e sorbatos mostraram a capacidade destes conservantes em inibirem alguns sistemas enzimáticos relacionados com algumas das principais vias metabólicas das bactérias nomeadamente, o ciclo do ácido cítrico, a fosforilação oxidativa (necessária para a produção de ATP), o metabolismo do ácido acético e, no caso dos fungos, verificou-se a inibição da produção de aflatoxinas [23].

Foram, ainda, propostos outros mecanismos de inibição do crescimento microbiano por sorbatos que passam por alterações na morfologia e funcionalidade da membrana plasmática [34].

1.3.5. Métodos para a determinação de conservantes

Já foi anteriormente referido (ver subcapítulos 1.3.1 e 1.3.2) que o ácido sórbico e o ácido benzoico não apresentam toxicidade para os humanos, no entanto, a ingestão frequente de doses superiores à DDA definida pelo JEFCA pode resultar em algumas reações adversas para o organismo humano.

Deste modo, é muito importante o desenvolvimento de métodos analíticos para garantir a segurança dos consumidores uma vez que só assim é possível monitorizar os níveis dos conservantes nos alimentos, avaliar o cumprimento dos teores máximos impostos pela legislação e comprovar a ausência destes aditivos em determinados tipos de alimentos [17,18,31,43].

O processo de desenvolvimento de um novo método analítico está condicionado por vários fatores, nomeadamente, o equipamento disponível no laboratório, a complexidade da matriz e a gama de aplicabilidade do método, isto é, se se pretende um método capaz de quantificar um ou mais tipos de aditivos em simultâneo, uma vez que a um género alimentício podem estar associados várias classes de aditivos e, se este método será utilizado para atividades de I&D ou em análises de rotina em laboratório [3].

Na literatura é possível encontrar inúmeras referências sobre o desenvolvimento de métodos para determinação e quantificação de conservantes em diferentes tipos de

matrizes alimentares, de entre os quais se destacam os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A utilização de outro tipo de métodos pode resultar em procedimentos complexos, com necessidade de utilizar extensas etapas de extração do analito e envolvendo um grande consumo de reagentes, por vezes, prejudiciais para a saúde do operador.

Os métodos envolvendo o uso de HPLC são altamente específicos e robustos, permitindo a detecção de múltiplos analitos, por vezes em baixas concentrações e, para a análise de conservantes, não requerem um complexo tratamento da amostra [44]. Contudo, nos métodos que envolvem a tecnologia de HPLC encontram-se variações ao nível do pré-tratamento das amostras, como por exemplo através do acoplamento a etapas de microextração em fase sólida [43], extração em fase sólida dispersiva [18] e, ao nível dos detetores onde se observou a detecção dos aditivos com recurso a absorção na gama do ultravioleta [17,18,31,37,39,40,43-55], e espectrometria de massa [56-58].

Na UE, a norma oficial EN 12856 publicada pelo Comité Europeu de Normalização, em 1998, descreve a análise de alguns edulcorantes e conservantes em diversas matrizes alimentares através de um método de HPLC com detecção por UV, e que não envolve um complexo pré-tratamento da amostra [59].

Em alternativa aos métodos por HPLC, têm sido desenvolvidos métodos baseados em outras técnicas analíticas como a cromatografia gasosa [60-62], eletroforese capilar [63-69], cromatografia eletrocínética micelar capilar [70], imunoensaio por fluorescência polarizada (FPIA) [71] e também por análise de injeção em fluxo (Flow Injection Analysis - FIA) [72] e espectrofotometria [27].

Embora os diversos métodos descritos na literatura se apresentem como alternativas viáveis, os métodos baseados em HPLC continuam a ser a opção de escolha de muitos laboratórios devido às vantagens, anteriormente descritas.

1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

1.4.1. Fundamentos e princípios

O termo cromatografia surgiu no início do século XX, através do trabalho do botânico russo Mikhail Tswett que desenvolveu uma coluna de cromatografia clássica e demonstrou a sua capacidade para separar os pigmentos de diferentes extratos de plantas. Tswett observou a separação dos pigmentos através da formação de bandas

coloridas na coluna, razão pela qual resolveu denominar esta técnica por cromatografia, junção das palavras gregas *chroma* (cor) e *graphein* (escrita) [73].

Foi nos anos 60, graças aos trabalhos desenvolvidos por dois grupos de estudo, um nos Estados Unidos sob a liderança de Csaba Horváth e outro na Europa pelas mãos de Josef Huber, que surgiram os primeiros equipamentos de HPLC [73-75].

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) representa o culminar da modernização da Cromatografia Líquida (LC) sendo, atualmente, uma das técnicas de separação mais utilizadas em química analítica [76], devido a características como a sua sensibilidade, automação, a sua precisão em análises quantitativas, e aplicabilidade a uma enorme variedade de amostras mais ou menos complexas (biomoléculas, antibióticos, pesticidas, organometálicos, e substâncias inorgânicas) e importantes para a indústria e para diversas áreas científicas [77] composto por um sistema de distribuição da fase móvel (reservatório dos reagentes e sistema de bombagem), um injetor que pode ser automático ou não, a coluna onde se dá a separação dos analitos e que pode ser de aço ou plástico, um detetor e um sistema de aquisição e tratamento de dados. Por vezes, encontram-se equipamentos de HPLC contendo um forno para poder controlar a temperatura da coluna [73]. Adicionalmente, os sistemas mais recentes de HPLC contêm também um sistema de desgaseificação para remover gases dissolvidos nos solventes e que podem afetar o desempenho do detetor [77].

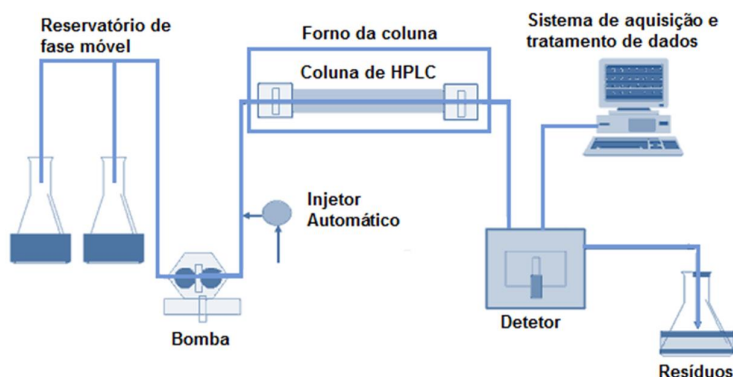


Figura 7 - Esquema representativo de um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) [78].

O **sistema de bombagem** de um aparelho de HPLC deve ser capaz de bombear a fase móvel com um caudal específico e a pressões elevadas de forma a poder atravessar a coluna. Deste sistema, também fazem parte dispositivos que permitem controlar o fluxo e programar a proporção de cada um dos solventes usados na fase móvel, no caso de uma eluição em gradiente [76,77].

Atualmente, a maioria dos **injetores** são automáticos, capazes de transferir a amostra para a fase móvel em condições de reprodutibilidade, e podem ainda possuir um sistema de controlo de temperatura para, por exemplo, possibilitar a ocorrência de reações de derivatização após a injeção [77]. A amostra, dissolvida na fase móvel, segue para a **coluna** cromatográfica, onde os vários analitos de interesse são separados com base em mecanismos de interação com a fase móvel e com a fase estacionária. Hoje em dia existe uma enorme variedade de enchimentos para a coluna de HPLC e a sua escolha vai determinar o sucesso do método analítico em termos de eficiência e seletividade na separação das espécies de interesse. A necessidade de um **forno** para controlar a temperatura da coluna surge da influência que este parâmetro exerce sobre o fator de retenção (k') e a seletividade do método [76].

Os analitos consoante a afinidade para com a fase estacionária vão sendo eluídos da coluna e passam por um **detetor**, que emite um sinal (ex: absorvância do analito) para um *software* de computador, este processa o sinal e gera um gráfico de unidades de absorvância em função do tempo de retenção, designado por cromatograma. A identificação dos analitos é feita com base nos tempos de retenção e, através da área dos respetivos picos é possível quantificá-los.

A separação dos vários analitos pode ocorrer de diferentes formas sendo a cromatografia por partição a mais utilizada. Este modo de separação pressupõe a partilha dos analitos pela fase móvel e estacionária com base na sua polaridade [77-79].

Deste modo, consoante a polaridade das fases móvel e estacionária é possível distinguir dois tipos de cromatografia por partição: cromatografia em fase normal (NP-HPLC) e cromatografia em fase reversa (RP-HPLC). A primeira consiste na utilização de uma fase estacionária com elevada polaridade (ex: trietilenoglicol ou água) e um solvente não polar (ex: hexano) como fase móvel resultando que os analitos de menor polaridade são os primeiros a serem eluídos [76,77].

Na separação por HPLC em fase reversa a fase estacionária possui um carácter não polar (ex: cadeia de hidrocarbonetos ligada a um suporte) e uma fase móvel polar (ex: acetonitrilo, metanol ou água) [77]. A fase estacionária, geralmente, consiste num suporte à base de sílica quimicamente modificada para promover a ligação de cadeias de hidrocarbonetos (ex: C8 e C18), hidrofóbicas, resultando num enchimento altamente estável e insolúvel na fase móvel [77-80].

Estima-se que 80 a 90% dos métodos de separação por HPLC utilizam colunas de fase reversa. A ampla gama de compostos que podem ser separados por esta técnica, acoplado aos diferentes mecanismos de interação (hidrofílicas, hidrofóbicas) e

ao crescente número de fases estacionárias disponíveis e com propriedades bastantes distintas, têm contribuído para a popularidade deste método [81-83].

1.4.2. Validação de um método analítico de HPLC

É de extrema importância que uma organização, seja ela farmacêutica, alimentar ou uma agência reguladora, garanta a qualidade dos seus ensaios analíticos, de modo a poder tomar as decisões mais acertadas evitando possíveis prejuízos [84]. Além disso, um método experimental de ensaio é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumularem erros pelo que pode levar a uma alteração significativa do valor do resultado final [85]. Assim, a validação de um método analítico surge como um aspeto crucial da garantia da qualidade analítica, através da qual se pretende uniformizar os critérios utilizados para demonstrar a fiabilidade do método, nas condições em que é praticado, garantindo a obtenção de resultados com a qualidade exigida e de modo a que, em qualquer futuro ensaio de análise de rotina, se obtenha resultados muito próximos ao verdadeiro valor do teor do analito presente na amostra [3,85,86].

A validação de um método é um processo contínuo que envolve o planeamento e aplicação do método e, caso se verifiquem alterações num método já implementado no laboratório é necessário proceder à sua revalidação [3,84]. Os ensaios de validação devem ser executados por pessoal competente e realizados em equipamentos e instrumentos dentro das especificações, e adequadamente calibrados [88].

Com o objetivo de validar um método de HPLC para a análise e quantificação de conservantes alimentares em géneros alimentícios avaliaram-se os seguintes parâmetros: a especificidade/seletividade, gama de aplicação/trabalho e linearidade da curva de calibração, sensibilidade, os limiares analíticos (limite de deteção e limite de quantificação), a precisão (repetibilidade e precisão intermédia), exatidão, robustez e a incerteza dos resultados [85,88,89].

a) Seletividade e especificidade

A seletividade e a especificidade são dois termos que envolvem o mesmo evento no método analítico, a deteção do analito, e por isso, passíveis de serem confundidos [89].

A **seletividade** surge como a capacidade de um método distinguir e quantificar um ou mais analitos numa matriz complexa sem interferência dos restantes compostos (impurezas, produtos de degradação, ou substâncias com propriedades idênticas às

do analito). Por sua vez, a **especificidade** de um método resume-se na capacidade de discriminar o (s) analito (s) relativamente a outras substâncias, ou seja, a resposta medida provém unicamente do composto de interesse [3,85]. Como a maioria dos métodos cromatográficos produz respostas para mais do que um composto de interesse, a IUPAC sugere que se evite o termo especificidade [84].

A seletividade do método analítico pode ser avaliada de várias formas, nomeadamente, pela comparação de uma matriz contendo o analito em questão com uma matriz isenta [88], ou no caso de se pretender validar um método de HPLC, avalia-se a resolução dos picos do cromatograma, a eficiência de separação e o fator de assimetria [89].

b) Gama de aplicação/trabalho

Para qualquer método analítico, existe uma gama de concentrações no qual o analito pode ser determinado com precisão, exatidão e linearidade, definida com **gama de trabalho ou aplicação**, onde o limite inferior corresponde ao limite de quantificação e o limite superior dependerá do sistema de resposta de medição [87-89].

Segundo a norma ISO 8466-1 . %Calibração e Avaliação de Métodos Analíticos e Estimativa das Características do Desempenho+, são recomendados dez padrões distribuídos equitativamente na gama de concentrações. Para métodos que envolvam a realização de uma curva de calibração, a avaliação da melhor gama de aplicação é efetuada através do teste de homogeneidade das variâncias ao primeiro (S^2_1) e último padrão (S^2_{10}) da curva de calibração, segundo as **Equações 1.1** e **1.2** de forma a observar possíveis diferenças significativas nos limites da gama de trabalho.

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (1.1)$$

Com,

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad (1.2)$$

Sendo: i . número do padrão; j . número de repetições efetuadas para cada padrão; y_i . valor do sinal no padrão i ; \bar{y}_i - média dos valores de y_i ; n_i . número de réplicas.

Para averiguar as possíveis diferenças entre as variâncias, é efetuado o cálculo do valor teste PG, através das **Equações 1.3** e **1.4**.

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} , \text{ quando } S_{10}^2 > S_1^2 \quad (1.3)$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} , \text{ quando } S_1^2 > S_{10}^2 \quad (1.4)$$

O resultado é então comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fischer, para n-1 graus de liberdade:

- Se PG<F: diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada.
- Se PG>F: diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao 1º e último padrão permitam obter PG<F [85].

c) Linearidade

A **linearidade** corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro da gama de trabalho definida [88]. Assim, existe a necessidade de conhecer a relação entre a resposta medida e a concentração de analito, tratando-se muitas vezes de uma relação linear direta. Tal é possível com a construção de uma curva de calibração que traduz esta relação linear de acordo com a **Equação 1.5**.

$$y = ax + b \quad (1.5)$$

Sendo: y - resposta medida (altura ou área do pico do cromatograma); x . concentração do analito; b - declive da curva de calibração; a . a ordenada na origem. Esta relação linear só é válida num intervalo específico de concentrações que se designa por faixa linear dinâmica [84].

O uso de curvas de calibração possibilita a avaliação da linearidade do método de múltiplas formas, nomeadamente, através do *Teste de Mandel* onde se calculam as funções linear e polinomial bem como os respetivos desvios-padrão residuais ($S_{y/x}$ e S_{y2}) [3,85]. A diferença de variâncias é então calculada pela **Equação 1.6**

$$DS^2 = (N - 2) \cdot S_{y/x}^2 - (N - 3) \cdot S_{y2}^2 \quad (1.6)$$

Sendo: N . o número de padrões de calibração; $S_{y/x}$. o desvio padrão residual da função linear; e S_{y2} . o desvio padrão da função polinomial.

Posteriormente, calcula-se o valor teste, PG, através da **Equação 1.7**:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad (1.7)$$

Este valor é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher:

- Se $PG \leq F$: a função de calibração é linear.
- Se $PG > F$: a função de calibração é não linear.

No caso de $PG > F$, deve-se avaliar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho.

Alternativamente, poder-se-á realizar o teste ANOVA para análise da variância da regressão linear [87] ou analisar o coeficiente de correlação (r) que deve ser superior a 0,995 [85].

d) Sensibilidade

A **sensibilidade** de um método analítico caracteriza-se pela capacidade do equipamento ou método responder a pequenas variações na concentração do analito, e traduz-se no quociente entre a variação do sinal medido Δy e a variação da concentração de analito ΔC , como representado pela **Equação 1.8**:

$$S = \frac{\Delta y}{\Delta C} \quad (1.8)$$

Para curvas de calibração que seguem um modelo linear a sensibilidade admite um valor constante igual ao declive (a) [85].

O estudo da sensibilidade torna-se importante quando se pretende averiguar a evolução desta grandeza ao longo do tempo, para comparar a sensibilidade entre vários métodos para o mesmo analito baseados em modelos lineares, ou quando se compara a sensibilidade para vários analitos [85].

e) Limiares analíticos

Na presença de amostras com baixos teores de analito ou na análise de uma propriedade (valores residuais) [87], é importante determinar qual o menor valor de concentração de analito que pode ser detetado e quantificado pelo método a ser validado. O cálculo dos limites analíticos envolve a determinação dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ).

O **limite de detecção (LOD)** corresponde ao teor mínimo do analito que pode ser detetado e distinguido do branco (amostra de igual matriz com ausência do analito), com uma certeza estatística razoável, mas não necessariamente quantificado como valor exato. No entanto, uma leitura inferior ao LOD não implica a ausência do analito [85].

Este parâmetro é expresso em unidades de concentração e, mediante a utilização de uma calibração linear é calculado pela **Equação 1.9**.

$$LOD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b} \quad (1.9)$$

Sendo: $S_{y/x}$. o desvio padrão residual da curva de calibração; e b . o declive da curva de calibração.

O **limite de quantificação (LOQ)** representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada, com uma precisão e exatidão aceitáveis [85]. É um parâmetro importante para ensaios quantitativos de compostos em baixas concentrações na matriz, e é particularmente usado na determinação de impurezas e/ou produtos de degradação [89].

Tal como o limite de detecção, o LOQ é expresso em unidades de concentração e é calculado através da equação **Equação 1.10**.

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (1.10)$$

Sendo: $S_{y/x}$. o desvio padrão residual da curva de calibração; e b . o declive da curva de calibração.

Na prática, o LOQ e o LOD correspondem, respetivamente, ao padrão de menor concentração e a 1/3 do limite de quantificação [85].

f) Repetibilidade do injetor

Um parâmetro a ser avaliado no processo de validação de métodos cromatográficos é a repetibilidade do injetor. Este indica o desempenho do sistema de HPLC no que diz respeito a bombas, coluna e condições de operação [90]. São executadas múltiplas injeções dos pontos extremos da curva de calibração. O resultado é expresso em termos de coeficiente de variação [3].

g) Precisão

A **precisão** de um método analítico representa o grau de dispersão dos resultados entre ensaios independentes repetidos em alíquotas da mesma amostra, homogênea, sob condições pré-estabelecidas [84,85,87,91]. Através dos estudos de precisão, avaliam-se os possíveis erros sistemáticos e aleatórios garantindo-se, assim, a qualidade dos resultados [86].

A concordância dos resultados é, geralmente, avaliada em condições de repetibilidade e precisão intermédia, e expressa em termos de desvio padrão, se o número de medidas for superior a 20, coeficiente de variação ou através do intervalo de confiança [84,85].

É aconselhado durante o processo de avaliação deste parâmetro, a análise de cada tipo de matriz de amostra, em separado, de modo a abranger por completo o intervalo de concentrações do analito em estudo, para poder concluir se o método é preciso independentemente da concentração da amostra [3,85].

A **repetibilidade** é uma medida de expressão da precisão de medições sucessivas sobre uma mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições de medição, isto é, mesmo laboratório, analista, equipamento e tipo de reagentes, sendo estas medições realizadas, de preferência, no mesmo dia.

Este parâmetro pode, assim, ser determinado através de ensaios efetuados no próprio laboratório. Procede-se a uma série de medições ($n \geq 6$) sobre uma mesma amostra, em condições de repetibilidade, que pode ser expressa em termos de desvio padrão relativo (**Equação 1.11**), para cada nível de concentrações [85].

$$RSD_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (1.11)$$

Sendo: RSD_r . desvio padrão relativo de repetibilidade; S_{ri} - desvio padrão absoluto de repetibilidade; \bar{x} - média dos valores considerados.

A **precisão intermédia** tal como o parâmetro anterior diz respeito à precisão de medições sucessivas sobre uma mesma amostra ou padrão, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas variando propositadamente determinadas condições tais como: diferente analista ou equipamento, em diferentes dias, ou sem calibração prévia do equipamento [85].

Das várias medidas de precisão, a precisão intermédia é o parâmetro mais representativo da variabilidade dos resultados num laboratório e, por isso, a sua avaliação é bastante aconselhada. [84,85].

Este parâmetro é expresso através da estimativa do desvio padrão absoluto (**Equação 1.12**) e pelo desvio padrão relativo (**Equação 1.13**).

$$S_{ri} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2} \quad (1.12)$$

Sendo: n . número de amostras; y_k . resultado individual obtido; \bar{y} - média aritmética dos resultados individuais obtidos.

$$RSD_R = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (1.13)$$

Sendo: RSD_R . desvio padrão relativo de precisão intermédia; S_{ri} - desvio padrão absoluto de precisão intermédia; e \bar{x} a média das concentrações do número de ensaios realizados.

h) Exatidão

A **exatidão** de um procedimento analítico define-se como o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro [84,85], funcionando como um indicador da utilidade e aplicabilidade do método em amostras reais [3].

Existem várias formas de avaliar a exatidão do método. Na validação de um método analítico deve ser feita a análise de **Materiais de Referência Certificados (MRC)**, fornecidos por organismos reconhecidos e credíveis, como por exemplo o *IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements)* ou o *NIST (National Institute of Standards and Technology)*, e que funcionam como um indicador externo de qualidade de uma análise química [84,85]. Em alternativa pode recorrer-se a Ensaio Interlaboratoriais (EI) regulados por Organismos como o *FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme)* e que estão também associados a MRC. Analisa-se o MRC e compara-se o resultado obtido com o respetivo valor certificado seguindo-se a determinação do erro e a exatidão da análise [85].

Os resultados obtidos são comparados com os valores certificados e é determinado o fator z-score (**Equação 1.14**), para avaliar o desempenho do laboratório na análise [85].

$$z = \frac{X_{lab} - X_v}{S} \quad (1.14)$$

Sendo X_{lab} . o valor obtido pelo laboratório; X_v . valor certificado do MRC; e S . unidade de desvio, que pode ser o valor da incerteza ou do desvio padrão do MRC.

O valor de z é depois avaliado numa escala que permite tirar conclusões acerca da exatidão do valor e, conseqüentemente, do método:

$$\begin{aligned} |z| &\leq 2, \text{ Satisfatório;} \\ 2 &< |z| \leq 3, \text{ Questionável;} \\ |z| &> 3, \text{ Incorreto.} \end{aligned}$$

Na ausência de um MRC ou de ensaios interlaboratoriais para estimar a exatidão do método de ensaio, podem ser usados os resultados obtidos nos ensaios de recuperação [92] ou através da comparação dos resultados obtidos pelo método a validar com os resultados conseguidos por um método tomado como referência [85].

i) Incerteza

O Guia ISO/IEC 99:2007 relativo ao Vocabulário Internacional de Metrologia define a incerteza de uma medição como um ~~parâmetro~~ parâmetro não-negativo que caracteriza a dispersão dos valores de uma grandeza que são atribuídos à mensuranda (concentração do analito) a partir das informações usadas+[93].

O Instituto Português da Acreditação desenvolveu um guia para o cálculo das incertezas onde descreve as várias abordagens envolvidas na determinação deste parâmetro, de entre as quais se destaca a abordagem baseada nos dados de validação. Esta abordagem envolve a utilização de parâmetros como a precisão e exatidão do método, para quantificar grande parte da incerteza associada ao ensaio químico [94].

A **incerteza associada à precisão** deve ser avaliada em condições de precisão intermédia de forma a refletir eventuais variações do método, através da alteração de alguns parâmetros que, em condições de repetibilidade se mantêm constantes. Assim, a incerteza relativa associada à precisão ($u_{\text{precisão}}$), é obtida através da **Equação 1.15**.

$$u'_{\text{precisão}} = \frac{S_{\text{precisão}}}{\bar{y}} \quad (1.15)$$

Na qual $S_{\text{precisão}}$ representa o desvio padrão relativo da precisão intermédia e \bar{y} - a média aritmética dos resultados individuais [94,95].

Por sua vez, a **incerteza associada à exatidão do método** está relacionado com o erro sistemático, que ocorre em todas as medições, e com o erro aleatório. Este tipo de incertezas pode ser quantificada a partir dos resultados de uma análise de um MRC. É estimada a recuperação média do método (\bar{R}_m) (**Equação 1.16**) e depois é calculada a incerteza padrão associada à exatidão $u(\bar{R}_m)$ através da **Equação 1.17**.

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{C}_{\text{obs}}}{C_{\text{MRC}}} \quad (1.16)$$

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{s_{\text{obs}}^2}{n \times C_{\text{obs}}} \right) + \left(\frac{u(C_{\text{MRC}})}{C_{\text{MRC}}} \right)^2} \quad (1.17)$$

Sendo \bar{C}_{obs} - a concentração média de uma série de análises do MRC, \bar{C}_{MRC} - o valor certificado do MRC, s_{obs} - o desvio padrão da série de análises do MRC, n - o número de análises do MRC e $u(C_{\text{MRC}})$ - a incerteza padrão associada ao teor certificado do MRC [94,95].

Determinadas as incertezas associadas à precisão e exatidão do método é possível calcular a incerteza combinada expandida através da **Equação 1.18**.

$$u(y) = y \times \sqrt{(u'_{\text{precisão}})^2 + \left(u\left(\overline{R_m}\right)^2\right)} \quad (1.18)$$

Onde y é o fator de expansão, que pode tomar valor igual a 1 (para n ensaios < 6) ou 2 (para n ensaios ≥ 6).

Sempre que se realizem um número elevado de ensaios experimentais, a incerteza combinada expandida pode ser estimada, para um nível de confiança igual a 95% [94,95].

j) Taxa de Recuperação

No caso de amostras de matriz complexa, as etapas de extração a serem executadas podem levar a perdas do analito. Assim, o resultado final da análise poderá ser inferior à concentração real do analito na amostra. Desta forma, a quantificação do analito pode ser estimada através da análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo [87]. A cada amostra devem ser adicionadas diferentes concentrações de analito, de acordo com a sua concentração esperada, por exemplo, próxima da concentração máxima de utilização, próxima do LOD e uma concentração próxima da gama de aplicação do método [3,96].

Os valores de taxa de recuperação devem estar compreendidos entre 80 e 120% e obtêm-se através da **Equação 1.19**.

$$\text{Taxa de Recuperação}(\%) = \frac{C_{\text{fortificada}} - C_{\text{matriz}}}{C_{\text{adicionada}}} \times 100 \quad (1.19)$$

Sendo: $C_{\text{fortificada}}$. concentração da amostra fortificada; C_{matriz} . concentração da amostra não fortificada; e $C_{\text{adicionada}}$. concentração adicionada de analito.

Capítulo 2

Materiais e Métodos



A metodologia, que foi seguida, teve como base a Norma Europeia (EN) 12856 referente à determinação de acessulfame-K, aspartame e sacarina por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (RP-HPLC) em vários géneros alimentícios. Este procedimento permite também a determinação dos conservantes ácido benzoico e ácido sórbico e, dos alcaloides, cafeína e teobromina [59].

No documento normativo estão descritas diferentes composições para a fase móvel. No entanto, estudos realizados previamente, no INSA, demonstraram que uma fase móvel constituída por tampão fosfato 0,0125M pH 3,5 + acetonitrilo (95:5 v/v) com um gradiente, proporcionou a melhor separação dos vários aditivos, pelo que se utilizou esta composição no presente trabalho.

As amostras foram, na sua maioria, homogeneizadas, dissolvidas e diluídas em água. Quando necessário, a solução resultante foi clarificada recorrendo ao uso de soluções de Carrez. O(s) analito(s) de interesse foram separados por HPLC em fase reversa e detetados, na região do UV, a 220 nm [59]. A quantificação dos aditivos alimentares foi realizada pelo método do padrão externo, com base no traçado de curvas de calibração.

2.1. Reagentes

Os padrões de ácido benzoico ($C_7H_6O_2$) e ácido sórbico ($C_6H_8O_2$) da *Merck* e *Sigma Aldrich*, respectivamente, foram adquiridos com um grau de pureza $\sim 99,9\%$, o acessulfame-K ($C_4H_4KNO_4S$) da *Fluka*, com um grau de pureza de 99%, o aspartame ($C_{14}H_{18}N_2O_5$), da *Sigma Aldrich*, com uma pureza superior a 98%, e os padrões de cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$) e sacarina sódica ($C_7H_4NNaO_3S$), da *Merck*, com uma pureza de 99,9% e $\sim 99,0\%$, respetivamente.

As soluções de Carrez usadas na preparação das amostras, foram preparadas com hexacianoferrato (II) de potássio tri-hidratado ($K_4[Fe(CN)_6]$) e sulfato de zinco hepta-hidratado ($[ZnSO_4 \cdot 7H_2O]$), ambos da *Merck*.

A fase móvel foi constituída por acetonitrilo (CH_3CN) para HPLC, da *Merck*, e tampão fosfato preparado a partir de fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4), da *Merck*, com um grau de pureza $\sim 99,9\%$. Foi, ainda, utilizada uma solução de ácido fosfórico a 5%, para acerto do pH do tampão fosfato, preparada a partir de ácido orto-fosfórico a 85% (H_3PO_4) da *Merck*.

A água utilizada na preparação das amostras, soluções-padrão, e tampão para fase móvel apresentou pureza de grau I (resistividade 18,5 $M\Omega \cdot cm$, a 25 °C), tendo sido obtida pelo sistema de purificação Mili-Q.

2.2. Preparação de soluções

Solução de ácido fosfórico a 5%: Pipetou-se 3 mL de ácido fosfórico 85% para um balão volumétrico de 50 mL, que continha 40 mL de água e completou-se o volume.

Solução de Carrez I: Pesou-se 15 g de hexacianoferrato (II) de potássio tri-hidratado para um balão volumétrico de 100 mL e perfez-se com água.

Solução de Carrez II: Pesou-se 30 g de sulfato de zinco hepta-hidratado para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se com água.

Ambas as soluções de Carrez são estáveis durante 6 meses e foram armazenadas no frigorífico a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Solução tampão fosfato 0,0125M: Pesou-se 3,40 g de fosfato de potássio monobásico anidro para um copo de 2 L e dissolveu-se com água. Acertou-se o pH até 3,5 com uma solução de ácido fosfórico a 5 % e transferiu-se para um balão volumétrico de 2 L. Por fim, completou-se o volume com água e procedeu-se à filtração da solução com um filtro de membrana (0,45 μm de porosidade).

Acetonitrilo a 10% (Solução de lavagem da agulha): Numa proveta de 1 L colocaram-se 100 mL de acetonitrilo para HPLC e completou-se o volume com água.

A **fase móvel** que foi utilizada era composta, no início do gradiente, por tampão fosfato e acetonitrilo numa proporção 95:5, respetivamente.

Todos os reagentes utilizados no sistema de HPLC, nomeadamente, o tampão fosfato, acetonitrilo, acetonitrilo a 10 % e água, foram previamente desgaseificados durante 20 minutos no desgaseificador.

2.2.1. Soluções padrão stock e padrão de calibração

As soluções padrão stock dos diversos aditivos foram preparadas com uma concentração de 1mg/mL. Para o efeito, pesou-se 50,0 mg de cada um dos padrões dos aditivos (ácido benzoico, ácido sórbico, acessulfame-K, aspartame e cafeína), e 66,2 mg do padrão de sacarina sódica, para balões volumétricos de 50 mL e diluiu-se com água. No caso dos conservantes, como são ácidos, foi necessário diluir inicialmente com 5 mL de acetonitrilo e só depois foi feita a diluição com água.

Para preparar as soluções padrão de calibração foram realizadas diluições (**Tabela 4**) em água, a partir das soluções padrão stock, para balões volumétricos de 50 mL de modo a corresponderem aos seis pontos da curva de calibração.

Tabela 4 - Volumes (mL) das várias soluções padrão stock (1 mg/mL) a adicionar para preparar as soluções padrão de ensaio e respetiva concentração (µg/mL).

| | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Concentração (µg/mL) | 4 | 10 | 16 | 24 | 32 | 40 |
| Ácido Benzoico (mL) | 0,2 | 0,5 | 0,8 | 1,2 | 1,6 | 2,0 |
| Ácido Sórbico (mL) | 0,2 | 0,5 | 0,8 | 1,2 | 1,6 | 2,0 |
| Acessulfame-K (mL) | 0,2 | 0,5 | 0,8 | 1,2 | 1,6 | 2,0 |
| Cafeína (mL) | 0,2 | 0,5 | 0,8 | 1,2 | 1,6 | 2,0 |
| Sacarina (mL) | 0,2 | 0,5 | 0,8 | 1,2 | 1,6 | 2,0 |
| Aspartame (mL) | 0,2 | 0,5 | 0,8 | 1,2 | 1,6 | 2,0 |

No caso específico do aspartame, as concentrações das soluções padrão de ensaio, presentes na **Tabela 4** são diferentes devido às características higroscópicas deste composto. Por isso, foi necessário determinar o teor de humidade do aspartame usado na preparação das soluções.

Para se determinar a humidade pesou-se 0,2 g de aspartame para uma cápsula de níquel, previamente pesada, que esteve na estufa a 100 °C durante a noite. O padrão de aspartame foi bem espalhado na superfície da cápsula para facilitar uma secagem homogénea e depois colocado na estufa durante três horas. Após este período, seguiu-se um arrefecimento de 15 a 20 minutos no exsiccador e procedeu-se à pesagem. Em seguida, colocou-se novamente a cápsula de níquel com o padrão na estufa por mais uma hora e repetiu-se o procedimento até obter peso constante. O valor da massa obtida foi introduzido numa folha de cálculo validada (**ANEXO I**) para se obter o teor de humidade no padrão bem como a concentração corrigida das soluções padrão de calibração (ver **Tabela 27** **É ANEXO I**).

2.3. Materiais e equipamentos

A homogeneização das amostras foi realizada com o auxílio de dois moinhos de faca *GRINDOMIX GM 200* e *GM 300* da *Retsch*.

Todas as pesagens foram efetuadas numa balança analítica *Mettler Toledo XP205*. Na preparação das amostras, além do material corrente de laboratório, foram utilizados filtros de seringa *VWR International* 25 mm, com membrana de poliétersulfona de 0,45 µm.

Na preparação da fase móvel foi utilizado um potenciómetro *Metrohm* 780, um sistema de desgasificação *Branson 3510*, da *Branson*, com controlo de tempo e temperatura e filtros de membrana *Pall* 47mm, com membrana de polipropileno hidrofílico de 0,45 µm.

Para a determinação dos aditivos alimentares foi utilizado um sistema cromatográfico de alta resolução da *Waters*, modelo A2695, equipado com uma bomba quaternária, coluna e respectivo forno, injetor automático e detetor de arranjo de díodos UV-Vis DAD também da *Waters*, modelo 2996. A separação dos analitos foi realizada numa coluna *Grace C18* de fase reversa com 5 µm de porosidade, 25 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro.

Toda a água de grau I utilizada na preparação das amostras e da fase móvel foi purificada através de um sistema de purificação de água *Milli-Q Element da Merck Millipore*.

2.4. Amostras

Para a validação do método analítico foram analisadas diversas matrizes alimentares, tais como, refrigerantes, marmeladas, iogurtes, margarina, pão e molhos (ketchup e maionese), as quais se encontram referidas na **Tabela 5**. As amostras foram adquiridas em supermercados e hipermercados na região de Lisboa entre maio e junho de 2014.

Tabela 5 Descrição das matrizes analisadas e dos diferentes analitos em estudo mencionados no rótulo.

| Amostra | Descrição | Aditivos | | | | | |
|--|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------|------------------|-----------------|---------|
| | | Ácido Benzoico e sais (E210-212) | Ácido Sórbico e sais (E200-202) | Acessulfame-K (E950) | Aspartame (E951) | Sacarina (E954) | Cafeína |
| Refrigerantes / Sumos de fruta | | | | | | | |
| A1 | Sumo de Ananás s/gás | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | x | x |
| A2 | Sumo de Maracujá e Laranja s/gás | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | x | x |
| A3 | Sumo de Limão s/gás | ✓ | ✓ | ✓ | x | x | x |
| A19 | Cola Light | ✓ | x | ✓ | ✓ | x | ✓ |
| A20 | Sumo de Laranja c/gás | x | ✓ | ✓ | ✓ | x | x |
| A21 | Sumo de Manga e Laranja s/gás | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | x |
| Marmeladas | | | | | | | |
| A4 | Marca 1 | ✓ | ✓ | x | x | x | x |
| A5 | Marca branca 1 | ✓ | ✓ | x | x | x | x |
| A7 | Marca 2 | ✓ | ✓ | x | x | x | x |
| A8 | Marca 3 (260g) | ✓ | ✓ | x | x | x | x |
| A9 | Marca 3 (450g) | ✓ | ✓ | x | x | x | x |
| A10 | Marca branca 2 | x | x | x | x | x | x |
| A11 | Marca 4 | x | x | x | x | x | x |
| A12 | Marca branca 2 | ✓ | ✓ | x | x | x | x |
| logurtes | | | | | | | |
| A6 | logurte de Pêssego e Chá verde | x | ✓ | ✓ | ✓ | x | x |
| A13 | logurte de Maçã e Ananás | x | ✓ | ✓ | ✓ | x | x |
| Molhos emulsionados e não-emulsionados | | | | | | | |
| A14 | Ketchup (Marca 1) | ✓ | ✓ | x | x | x | x |
| A15 | Ketchup (Marca 2) | x | ✓ | x | x | x | x |
| A16 | Maionese Light (Marca 1) | x | ✓ | x | x | x | x |
| A17 | Maionese (Marca 2) | x | ✓ | x | x | x | x |
| A22 | Margarina Líquida | x | ✓ | x | x | x | x |
| Produtos de pastelaria | | | | | | | |
| A23 | Bolo Doce de ovos | ✓ | ✓ | x | x | x | x |
| Produtos de panificação | | | | | | | |
| A18 | Pão em fatias | x | ✓ | x | x | x | x |

Todos os produtos se encontravam dentro do prazo de validade e, após a sua análise alguns foram armazenados numa câmara frigorífica a $5\pm3^{\circ}\text{C}$ e outros congelados numa arca congeladora a temperaturas inferiores a -20°C .

2.5. Procedimento experimental

2.5.1. Preparação das amostras

As várias amostras foram submetidas a diferentes métodos de tratamento, consoante se tratavam de líquidos, sólidos ou semi-sólidos.

Para as amostras líquidas como é o caso dos iogurtes e dos sumos, pipetou-se 10 mL da amostra para um balão volumétrico de 100 mL, que já continha 50 mL de água. Em seguida, adicionou-se 2 mL da solução de Carrez I, agitou-se e, adicionou-se 2 mL da solução de Carrez II. Agitou-se vigorosamente a solução e deixou-se em repouso durante 10 minutos. No final, aferiu-se o volume do balão com água.

No caso dos sumos com gás, estes foram previamente desgaseificados durante 30 minutos no desgaseificador antes do tratamento com as soluções de Carrez.

Da mesma forma, para as amostras sólidas e semi-sólidas como marmeladas, molhos, pão e bolo, pesou-se 10 g de amostra para um balão volumétrico de 100 mL, que continha 50 mL de água e, colocou-se no banho de ultrassons a aproximadamente 40 °C durante 20 minutos. Em seguida, adicionou-se um volume de 2 mL quer da solução de Carrez I, quer da solução de Carrez II, da mesma forma que na preparação anterior. No fim, completou-se o volume até 100 mL com água. Relativamente às amostras de pão, bolo e marmeladas foram previamente trituradas e homogeneizadas num moinho de facas. A etapa de moagem consistiu em três ciclos de 20 segundos a 4000, 6000 e 9000 rpm para o pão, dois ciclos de 20 segundos a 5000 e 9000 rpm para as marmeladas e três ciclos de 60 segundos a 3000 e 4000 (2x) rpm para o bolo.

As soluções obtidas foram, de seguida, filtradas com filtro de papel com pregas para erlenmeyers de 500 mL e, depois com um filtro de polipropileno de 0,45µm usando seringas de 10 mL.

No fim, transferiu-se uma alíquota de cada uma das amostras para *vial*s e introduziu-se no injetor automático para análise no sistema cromatográfico.

Todas as amostras foram analisadas em triplicado sob condições rigorosas de pipetagem e pesagem. A terceira toma foi fortificada com uma quantidade conhecida do analito (**Figura 8**) proveniente das soluções padrão *stock*, com o objetivo de determinar a taxa de recuperação dos respetivos aditivos em cada ensaio.

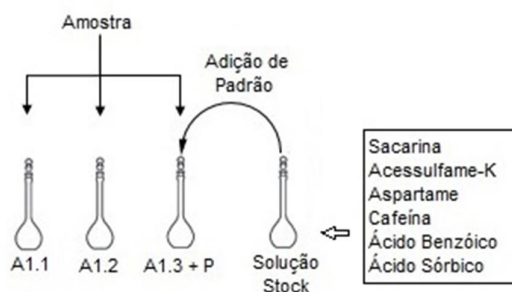


Figura 8 É Representação do procedimento de adição de padrão.

2.5.2. Condições cromatográficas

Na **Tabela 6** estão descritas as condições cromatográficas utilizadas no método analítico, com base na norma EN 12856.

Tabela 6 - Condições cromatográficas utilizadas na análise das amostras e das soluções padrão.

| Parâmetros | Condições |
|---------------------------------|--|
| Modo de Separação | Fase Reversa |
| Composição Fase Móvel | Tampão fosfato (95-88%) e Acetonitrilo (5-12%) em modo gradiente |
| Fluxo | 1 mL/min |
| Volume de injeção | 20 µL |
| Comprimento de onda de detecção | 220 nm |
| Temperatura do forno da coluna | 37°C |
| Temperatura das amostras | 10°C |
| Tempo de corrida | 55 min |

Sempre que a concentração de um determinado analito numa dada amostra não se encontrava dentro dos limites da curva de calibração, procedeu-se ao ajuste do volume injetado ou da concentração da solução da amostra.

2.6. Identificação e quantificação do analito

A identificação dos analitos foi feita por comparação com os tempos de retenção obtidos em idênticas condições experimentais para as soluções padrão.

A quantificação foi efetuada pelo método do padrão externo recorrendo-se a uma curva de calibração que expressa a relação entre a concentração das soluções padrão e as áreas dos respetivos picos no cromatograma.

A determinação do teor de cada um dos analitos , em mg/L ou a fração mássica w , em mg/kg, foi feita com base na **Equação 2.1** descrita na norma EN 12856:

$$\rho \text{ ou } w = \frac{C \times F \times V_1}{m_0} \times 1000 \quad (2.1)$$

Sendo C . a concentração do analito na amostra em mg/kg ou mg/L; F . o fator de diluição; V_1 - o volume da solução de amostra e m_0 . a massa ou volume de toma de amostra em gramas ou mililitros.

2.7. Processo de validação do método

O processo de validação do método envolveu a avaliação de parâmetros como a gama de trabalho, a linearidade do método na gama de trabalho validada, a sensibilidade, os limites analíticos (LOD e LOQ), a repetibilidade e linearidade do injetor. Foram realizados estudos de precisão em condições de repetibilidade e precisão intermédia. Houve, também, a oportunidade de participar em dois ensaios interlaboratoriais a fim de se determinar a exatidão do método. Através dos resultados obtidos nos vários ensaios foi possível determinar a incerteza do método.

O procedimento utilizado para avaliar cada um destes parâmetros está descrito em vários guias de validação de entidades de referência como a ICH, a RELACRE, e o Guia de Validação de Métodos Cromatográficos do INSA e, presente na **Tabela 7**.

Tabela 7 É Procedimento para avaliação dos vários parâmetros de validação do método.

| Parâmetro | Procedimento |
|--------------------------------|--|
| Especificidade e Seletividade | Consistiu na injeção de duas amostras, uma contendo os ácidos sórbico e benzoico e uma isenta de ambos os analitos. |
| Gama de Trabalho | A partir da solução <i>stock</i> foram preparadas dez réplicas das soluções padrão de calibração equivalentes ao primeiro e último ponto da curva de calibração (2, 4 e 40 µg/mL) e uma réplica para cada um dos pontos intermédios (10, 16, 24 e 32 µg/mL). No fim, calculou-se a variância (S_i^2) das dez réplicas e averiguou-se a homogeneidade das variâncias por comparação do valor PG com o valor da Distribuição F de Snedecor/Fisher. |
| Linearidade | Envolveu a construção de uma curva de calibração para cada analito e análise do coeficiente de determinação (r^2), dos resíduos e a realização do <i>Teste de Mandel</i> para comparação dos modelos linear e polinomial. |
| Sensibilidade | A sensibilidade do método foi avaliada com base nos declives das curvas de calibração obtidas para os vários ensaios realizados durante a validação do método. |
| Limites Analíticos (LOQ e LOD) | Os limites de quantificação (LOQ) e deteção (LOD) foram determinados com base no desvio padrão residual da curva de calibração ($S_{y/x}$) e no respetivo declive (a). |
| Limites do Método | Os limites analíticos, em µg/mL, foram convertidos em g/kg ou g/L, tendo em conta a toma de amostra efetuada e os fatores de diluição aplicados. |
| Repetibilidade | Envolveu a preparação e injeção de 6 réplicas de cada amostra, em condições de repetibilidade, e a determinação do respetivo desvio padrão relativo (RSD _r). |
| Precisão Intermédia | Consistiu na realização de três ensaios de repetibilidade e determinação do respetivo desvio padrão relativo (RSD _R). |
| Exatidão | Foi avaliada através da determinação do valor z-score a partir dos resultados obtidos em ensaios interlaboratoriais. |
| Incerteza | Foi determinada a partir dos resultados de precisão intermédia e de exatidão. |

Os resultados obtidos foram introduzidos em folhas de cálculo validadas.

Adicionalmente, utilizou-se o método para a determinação de edulcorantes, devido à presença destes aditivos em várias das amostras analisadas.

Capítulo 3

Apresentação e Discussão dos Resultados

Capítulo 3 . Apresentação e Discussão dos Resultados

Como já foi referido nos capítulos anteriores, neste trabalho, foi utilizado o procedimento descrito na norma EN 12856 para a validação de um método analítico de HPLC-UV para a determinação quantitativa de conservantes alimentares em diversas matrizes alimentares.

Este procedimento, já utilizado no INSA, está validado para a quantificação de edulcorantes intensos em adoçantes de mesa [97].

Na **Figura 9**, apresenta-se um cromatograma relativo à análise de uma solução padrão de calibração contendo os edulcorantes intensos acessulfame-K, aspartame e sacarina, a cafeína e os conservantes ácido benzoico e ácido sórbico, que são objeto deste estudo, onde é possível observar a boa resolução dos diversos picos evidenciando uma separação eficaz de todos os analitos.

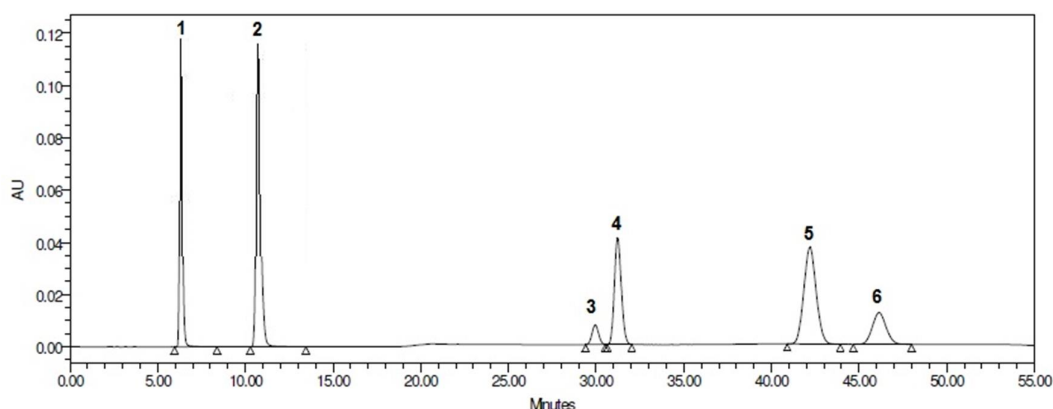


Figura 9 É Cromatograma da solução padrão (40 µg/mL) contendo 1 - Acessulfame-K ($t_r=6,31$ min), 2 - Sacarina ($t_r=10,69$ min), 3 - Aspartame ($t_r=29,98$ min), 4 - Cafeína ($t_r=31,25$ min), 5 - Ácido benzoico ($t_r=42,24$ min) e 6 - Ácido sórbico ($t_r=46,19$ min).

3.1. Validação do método analítico

3.1.1. Especificidade e seletividade

Para quantificar um determinado analito em diferentes tipos de amostras que, por vezes, podem ser bastante complexas e possuírem na sua constituição espécies interferentes, é muito importante averiguar se o método de análise que vai ser utilizado é específico para o(s) analito(s) em questão.

Como tal, procedeu-se à análise de duas marmeladas onde, uma delas continha ácido benzoico e ácido sórbico (**Figura 10**) e, a outra, estava isenta destes dois conservantes (**Figura 11**).

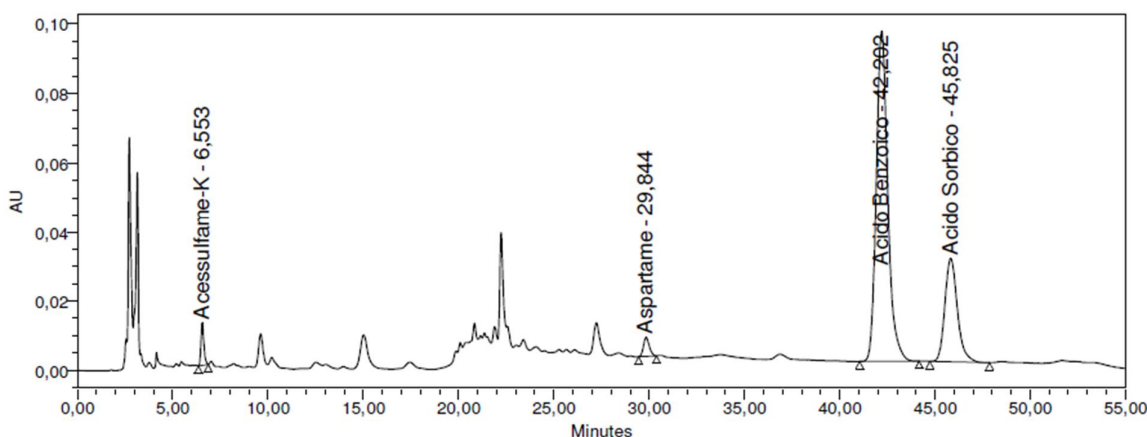


Figura 10 É Cromatograma de uma amostra de marmelada com Ácido Benzoico ($t_r=42.20$ min) e Ácido Sórbico ($t_r=45.82$ min).

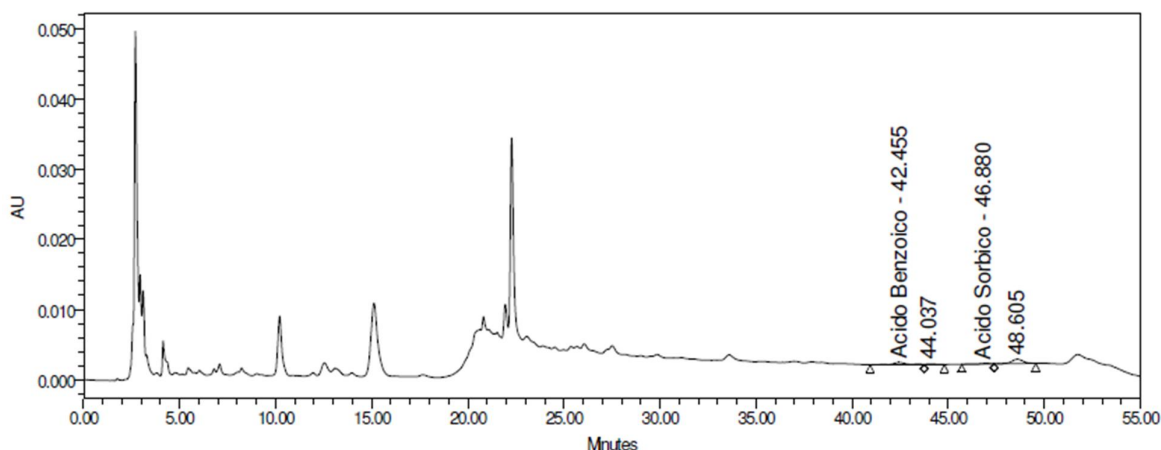


Figura 11 É Cromatograma de uma amostra de marmelada sem os conservantes Ácido Benzoico e Ácido Sórbico.

Ao comparar os cromatogramas verificou-se não existir qualquer sinal nos tempos de retenção dos dois conservantes no cromatograma da marmelada que não os apresenta, podendo afirmar-se que o método é específico para os dois analitos.

3.1.2. Validação da Gama de Trabalho

Para a validação da gama de trabalho a usar foram avaliados os intervalos de concentração entre 2 e 40 $\mu\text{g/mL}$ e entre 4 e 40 $\mu\text{g/mL}$, com base em trabalhos de validação usando a norma EN 12856, anteriormente efetuados no DAN.

Como descrito no subcapítulo 1.4.2 e referido na **Tabela 7** a validação da gama de trabalho envolve a preparação de 10 réplicas dos padrões correspondentes aos pontos extremos da gama de concentração, bem como uma réplica por cada ponto intermédio da curva, tal como está descrito na **Tabela 8**.

Tabela 8 É Processo para validação da gama de trabalho.

| Concentração da Solução Padrão (µg/mL) | 2 | 4 | 10 | 16 | 24 | 32 | 40 |
|--|----|----|----|----|----|----|----|
| Nº de réplicas | 10 | 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10 |

No **Anexo II** está apresentado um exemplo da folha de cálculo usada para a avaliação da homogeneidade das variâncias.

A partir dos resultados obtidos (**Tabela 9**) averiguou-se a existência ou não de homogeneidade das variâncias em ambas as gamas para os ácidos sórbico e benzoico.

Tabela 9 É Sinal (área do pico) das dez réplicas relativas aos pontos extremos (2 µg/mL, 4 µg/mL e 40 µg/mL) das gamas de trabalho em estudo e respetiva variância (S_i^2).

| Nº Réplica | Sinal (área do pico) | | | | | |
|------------|----------------------|-----------|-----------|---------------|----------|----------|
| | Ácido Benzoico | | | Ácido Sórbico | | |
| | 2 µg/mL | 4 µg/mL | 40 µg/mL | 2 µg/mL | 4 µg/mL | 40 µg/mL |
| 1 | 164883 | 303791 | 2934121 | 77214 | 117015 | 1119068 |
| 2 | 122132 | 319718 | 2934724 | 62919 | 126205 | 1100380 |
| 3 | 156316 | 310753 | 2935134 | 56683 | 124059 | 1111624 |
| 4 | 159052 | 332308 | 2932097 | 63316 | 106143 | 1109401 |
| 5 | 141322 | 320150 | 2928252 | 63624 | 123780 | 1115932 |
| 6 | 138062 | 317062 | 2927714 | 48242 | 105547 | 1101976 |
| 7 | 165399 | 308289 | 2905822 | 67770 | 121897 | 1108055 |
| 8 | 156499 | 332400 | 2933368 | 64861 | 112990 | 1103602 |
| 9 | 130482 | 314652 | 2926396 | 55698 | 123786 | 1104005 |
| 10 | 131271 | 303359 | 1600623 | 62310 | 119567 | 1096374 |
| S_i^2 | 247696794 | 107129966 | 124656898 | 59427477 | 56688455 | 50683985 |

Através da **Equação 1.1** calcularam-se as variâncias das dez réplicas para os pontos extremos da curva e, recorrendo às **Equações 1.3 e 1.4** determinaram-se os valores PG (**Tabela 10**), os quais foram comparados com os respetivos valores tabelados da distribuição F de *Snedecor/Fisher* para n-1 graus de liberdade.

Tabela 10 É Valores de PG e da distribuição F de Snedecor/Fisher para avaliação da validade da gama de trabalho.

| Gama de trabalho | Ácido Benzoico | | Ácido Sórbico | |
|------------------|----------------|--------------------|---------------|--------------------|
| | PG | Valor F (tabelado) | PG | Valor F (tabelado) |
| 2 - 40 (µg/mL) | 2,77 | 5,35 | 1,17 | 5,35 |
| 4 - 40 (µg/mL) | 1,16 | | 1,12 | |

Para as duas gamas de trabalho e para os dois analitos, verificou-se homogeneidade das variâncias por comparação dos valores de PG com os valores de F, confirmando-se desta forma que os intervalos estão ajustados e validadas ambas as gamas de trabalho. No entanto, a adequabilidade do intervalo de concentrações de 2 a 40 µg/mL à determinação do ácido benzoico ficou comprometida, pois no cálculo do limite de quantificação através da curva de calibração (**Equação 1.9**), este deu superior ao primeiro ponto da curva (LOQ = 5,42 µg/mL), o que pode conduzir a resultados pouco precisos quando estes se encontrem a concentrações próximas dos 2 µg/mL. Por esta razão, a gama de concentrações entre os 4 e os 40 µg/mL foi a escolhida para o presente trabalho.

3.1.3. Linearidade da gama de trabalho

Para a avaliação da linearidade da gama de trabalho, procedeu-se à construção de uma curva de calibração que permitiu estabelecer a relação entre o sinal medido (área do pico) e a concentração do analito na solução padrão.

Tal como descrito no subcapítulo 1.4.2 (b), é possível avaliar a linearidade do método de diferentes formas, todas com base na curva de calibração.

Na **Figura 12** estão representadas curvas de calibração para o ácido benzoico e para o ácido sórbico.

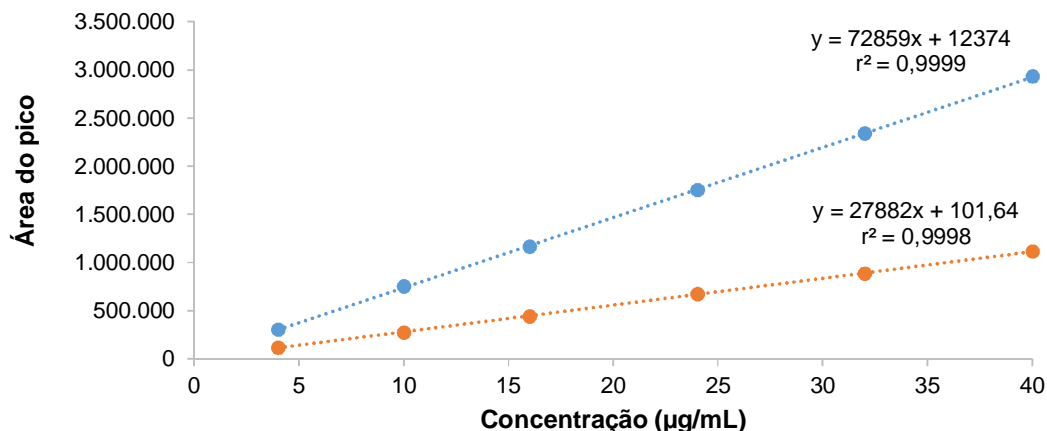


Figura 12 É Curva de calibração (área do pico vs concentração do analito) do ácido benzoico e do ácido sórbico obtidas nos ensaios para a validação da gama de trabalho.

De acordo com os principais guias de validação de métodos analíticos, o coeficiente de correlação (r) deve ser superior a 0,995 para ser usado como critério de aceitação da linearidade da gama de trabalho utilizada. Este critério foi sempre cumprido ao longo dos vários ensaios, no entanto, optou-se por seguir um parâmetro mais fiável o coeficiente de determinação (r^2). Como se pode observar da figura anterior, para ambas as curvas de calibração foram obtidos coeficientes de determinação superiores a 0,995.

Adicionalmente, foi efetuada uma análise aos resíduos percentuais gerados para cada padrão da curva (Figura 13). A percentagem máxima de 10% para aceitação dos resíduos dos diferentes pontos da curva de calibração foi definida pelo controlo de qualidade interno do INSA [98].

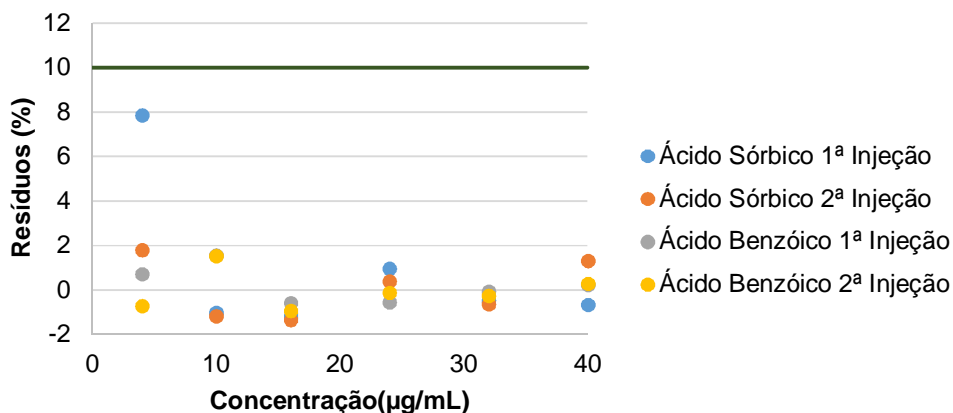


Figura 13 É Análise dos resíduos (%) nos diferentes pontos da curva de calibração.

Na **Figura 12** é possível observar que, para qualquer um dos pontos da curva de calibração os resíduos foram inferiores a 10% e, pouco variáveis ao longo da curva, com exceção da 1ª injeção do padrão de 4 µg/mL para o ácido benzoico.

No decorrer do processo de validação, como já foi dito, alargou-se a gama de aplicação do método à determinação de edulcorantes intensos. Por isso, sempre que necessário, foi construída uma curva de calibração para cada um dos aditivos (**Tabela 11**) e analisados os resíduos da curva e o coeficiente de determinação como critérios para a aceitação das curvas de calibração.

Tabela 11 Equações das curvas de calibração para os cinco analitos a que o método foi aplicado.

| Analito | Curva de Calibração | r^2 | r |
|----------------|------------------------|--------|--------|
| Acessulfame-K | $y = 56300 x + 17300$ | 0,9999 | 0,9999 |
| Sacarina | $y = 91400 x - 4420$ | 0,9998 | 0,9998 |
| Aspartame | $y = 8600 x + 1970$ | 0,9999 | 0,9999 |
| Cafeína | $y = 47800 x + 6210$ | 0,9999 | 0,9999 |
| Ácido Benzoico | $y = 72859 x + 12374$ | 0,9999 | 0,9999 |
| Ácido Sórbico | $y = 27882 x + 101,64$ | 0,9998 | 0,9998 |

Para os ácidos benzoico e sórbico foi ainda realizado o teste de *Mandel* para demonstrar a adequabilidade da função de calibração a um modelo linear comparativamente a um ajuste polinomial. No **Anexo III** está apresentado um exemplo da folha de cálculo usada para a realização do teste de *Mandel*.

Através da diferença das variâncias de ambos os ajustes (**Equação 1.6**) e do desvio padrão residual do ajuste polinomial foi calculado o valor de PG (**Equação 1.7**) para cada curva de calibração o qual foi igual a 4,36 e 1,34 para o ácido benzoico e ácido sórbico, respetivamente. Ao comparar estes resultados com o valor da distribuição F de *Snedecor/Fisher*, para n-3 graus de liberdade, o qual é de 10,56, como ambos os valores de PG foram inferiores ao valor F, conclui-se que existe um bom ajuste dos pontos podendo ser utilizado um modelo linear.

3.1.4. Sensibilidade

A capacidade de resposta do método à variação da concentração de analito, ou seja, a sua sensibilidade, foi avaliada com base nos declives das curvas de calibração preparadas a cada novo ensaio. Foi feita a média dos declives e calculado o desvio padrão relativo (**Equação 1.11**) para averiguar a existência de desvios ao longo do processo de validação do método de análise. Os resultados relativos a este parâmetro encontram-se apresentados na **Tabela 12**.

Tabela 12 É Sensibilidade do método, em UA/(mg.L⁻¹), e sua variação (%) ao longo do processo de validação do método de análise.

| | Ácido Benzoico | Ácido Sórbico |
|---|----------------|---------------|
| Sensibilidade (UA/(mg.L⁻¹)) | 73345 | 28065 |
| Desvio padrão S (UA/(mg.L⁻¹)) | 1435 | 693 |
| Desvio padrão relativo RSD (%) | 1,96 | 2,47 |

Sendo os valores do coeficiente de variação cerca de 2% para ambos os analitos, pode referir-se que o método manteve uma sensibilidade aproximadamente constante ao longo dos vários ensaios que foram realizados.

3.1.5. Limites analíticos de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e Limites do método

No subcapítulo 1.4.2, foram apresentadas as diferentes maneiras de calcular os limites analíticos de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).

Neste trabalho optou-se por definir como limite de quantificação o primeiro ponto da curva de calibração, 4 µg/mL e como limite de detecção 1/3 do limite de quantificação ou seja, 1,3 µg/mL, para os dois analitos.

Ao mesmo tempo, avaliou-se em cada ensaio o valor de cada limite através das **Equações 1.9 e 1.10**. À exceção de dois ensaios, os valores do LOQ estiveram sempre inferiores a 4 µg/mL, confirmando a validade deste parâmetro. O mesmo se verificou para o limite de detecção.

Seguidamente, foram calculados os limites do método. Estes dependem do tipo de amostra analisada, líquida ou sólida, e têm em conta os limites analíticos (1,3 e 4 µg/mL), a toma de amostra máxima realizável para análise (20 mL ou 20 g), bem como o volume máximo de diluição (100 mL) e fatores de diluição, de acordo com a **Equação 2.1**.

Determinou-se que o limite de quantificação do método para análise dos ácidos benzoico e sórbico é igual a 20 mg/kg e 20 mg/L, para as amostras sólidas e líquidas, respetivamente. Da mesma forma, considerou-se o limite de detecção como sendo 1/3 do limite de quantificação, ou seja, 6,7 mg/kg e 6,7 mg/L.

3.1.6. Repetibilidade e linearidade do injetor

A conformidade do injetor do sistema de HPLC é um parâmetro complementar ao processo de validação, no entanto é importante para avaliar se este se encontra bem calibrado e para determinar o erro associado às injeções efetuadas.

Deste modo, avaliaram-se dois parâmetros representativos da capacidade de resposta do injetor, nomeadamente, a repetibilidade e a linearidade do injetor.

Os estudos de repetibilidade do injetor consistiram em injeções sucessivas das soluções padrão correspondentes ao primeiro e último ponto da curva, ou seja, 4 µg/mL e 40 µg/mL, respetivamente e, na determinação do coeficiente de variação associado às injeções realizadas. Segundo o protocolo sobre a validação de métodos cromatográficos estabelecido pelo INSA, o coeficiente de variação deve ser inferior a 5% [98].

Estes resultados encontram-se na **Tabela 13**. O desvio padrão relativo foi calculado a partir da **Equação 1.11**.

Tabela 13 Valores do sinal (área do pico) para as 10 injeções das soluções-padrão (4 µg/mL e 40 µg/mL) do ácido benzoico e ácido sórbico e média, desvios padrão absoluto (S) e relativo (RSD), para avaliação da repetibilidade do injetor.

| Injeção | Sinal (Área do pico) | | | |
|---------------|----------------------|-----------|---------------|----------|
| | Ácido Benzoico | | Ácido Sórbico | |
| | 4 µg/mL | 40 µg/mL | 4 µg/mL | 40 µg/mL |
| 1 | 324882,5 | 2719486,0 | 110168,0 | 922427,5 |
| 2 | 325938,5 | 2715550,0 | 113051,0 | 924295,0 |
| 3 | 325704,0 | 2710596,0 | 112987,5 | 928523,0 |
| 4 | 324192,0 | 2698565,0 | 111193,5 | 921450,0 |
| 5 | 324330,5 | 2715842,0 | 111050,5 | 930748,0 |
| 6 | 324540,0 | 2710284,0 | 111812,0 | 920919,0 |
| 7 | 326135,5 | 2720448,0 | 113031,0 | 929781,0 |
| 8 | 325589,0 | 2711782,0 | 110615,5 | 931816,0 |
| 9 | 325484,5 | 2715122,0 | 110126,5 | 940428,0 |
| 10 | 324739,5 | 2732456,0 | 110333,0 | 946315,0 |
| Média | 325153,6 | 2715013,1 | 111436,9 | 929670,3 |
| S | 700 | 8677 | 1207 | 8336 |
| RSD(%) | 0,22 | 0,32 | 1,08 | 0,90 |

Como se pode observar pelos valores de coeficiente de variação, em qualquer um dos casos este foi inferior a 5 %, indicando que o injetor apresenta um nível de repetibilidade aceitável.

Capítulo 3 . Apresentação e Discussão dos Resultados

Em seguida, avaliou-se a capacidade de resposta do injetor a variações no sistema. Foram feitas sucessivas injeções de uma das soluções padrão variando, entre cada ensaio, o volume de injeção, na gama entre 10 e 200 μL .

Pretendeu-se, assim, verificar se o injetor era capaz de responder de forma linear à alteração do volume injetado. Na **Tabela 14** estão apresentados os resultados obtidos para o ensaio.

Tabela 14 Valores do sinal (área do pico) para a gama de volumes de injeção (10 a 200 μL) da solução-padrão (24 $\mu\text{g/mL}$) de ácido benzoico e ácido sórbico, para avaliação da linearidade do injetor.

| Volume (μL) | Sinal (Área do pico) | | | | | |
|-----------------------------|----------------------|------------|------------|---------------|------------|-----------|
| | Ácido Benzoico | | | Ácido Sórbico | | |
| | 1ª Injeção | 2ª Injeção | Média | 1ª Injeção | 2ª Injeção | Média |
| 10 | 887287,0 | 886943,0 | 887115,0 | 336134,0 | 332557,0 | 334345,5 |
| 20 | 1797959,0 | 1797712,0 | 1797835,5 | 675378,0 | 672764,0 | 674071,0 |
| 40 | 3634282,0 | 3642598,0 | 3638440,0 | 1367013,0 | 1370172,0 | 1368592,5 |
| 60 | 5484961,0 | 5484611,0 | 5484786,0 | 2056847,0 | 2062378,0 | 2059612,5 |
| 80 | 7304054,0 | 7300622,0 | 7302338,0 | 2739259,0 | 2733968,0 | 2736613,5 |
| 100 | 9119091,0 | 9114702,0 | 9116896,5 | 3414085,0 | 3409597,0 | 3411841,0 |
| 120 | 10944729,0 | 10940625,0 | 10942677,0 | 4093282,0 | 4089735,0 | 4091508,5 |
| 140 | 12757852,0 | 12857202,0 | 12807527,0 | 4761258,0 | 4766316,0 | 4763787,0 |
| 160 | 14535596,0 | 14549613,0 | 14542604,5 | 5430279,0 | 5425496,0 | 5427887,5 |
| 180 | 16355979,0 | 16359121,0 | 16357550,0 | 6110477,0 | 6107248,0 | 6108862,5 |
| 200 | 18157705,0 | 18166265,0 | 18161985,0 | 6777821,0 | 6775460,0 | 6776640,5 |

Através do valor médio para cada uma das injeções foi feita uma representação gráfica que mostra a relação entre a área dos picos do cromatograma e o volume de injeção. Para avaliar a linearidade foi feita uma regressão linear aos resultados, onde se espera que o coeficiente de determinação, r^2 , seja, no mínimo, de 0,995.

Atendendo à **Figura 14**, é possível observar claramente uma relação proporcional entre a área do pico e o volume de injeção uma vez que através da regressão linear se obteve para ambos os analitos um coeficiente de determinação (r^2) igual a 1.

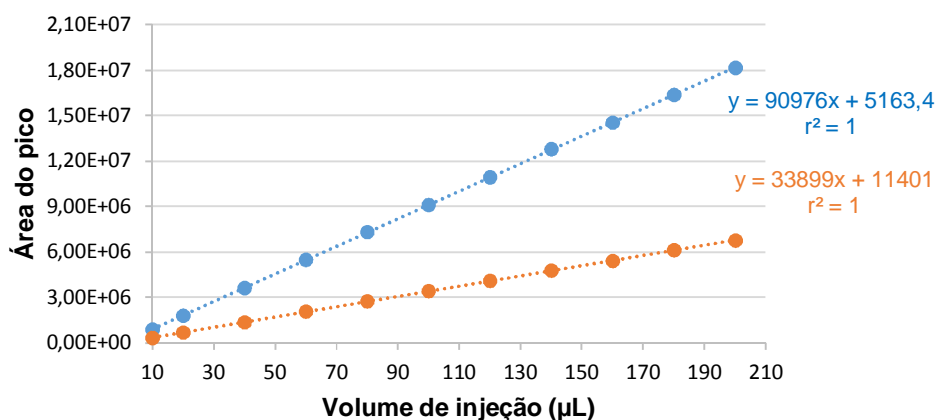


Figura 14 É Representação gráfica dos valores da área do pico vs volumes de injeção da solução padrão (24 µg/mL) de **ácido benzoico** e **ácido sórbico**, para avaliação da linearidade do injetor.

Tendo em atenção estes resultados bem como os obtidos para a repetibilidade, pode afirmar-se que o injetor se encontra em perfeitas condições de funcionamento e pode ser utilizado com a função de diluir ou concentrar a amostra a analisar.

3.1.7. Precisão

Neste trabalho realizaram-se inúmeros estudos de precisão de forma a cobrir a grande variedade de matrizes disponíveis no mercado e, assim, garantir que o método é preciso independentemente da concentração do analito na amostra e da matriz. Tal como descrito no subcapítulo 1.4.2 (g) foram avaliados dois tipos de precisão: a repetibilidade (ou precisão intra-ensaio) e a precisão intermédia.

A primeira consistiu na realização de um ensaio onde se efetuaram seis tomas da amostra, nas mesmas condições operatórias, isto é, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo dia, etc.

Por sua vez, a precisão intermédia do método foi avaliado através da realização de três ensaios de repetibilidade, em dias diferentes.

Para ambos os ensaios foram calculados os desvios-padrão relativos de repetibilidade (RSD_r) e de precisão intermédia (RSD_R), de acordo com as **Equações 1.11** e **1.13**. Estes resultados foram obtidos através das folhas de cálculo apresentadas nos **ANEXOS V** e **VI**.

Devido ao elevado número de amostras estudadas nos ensaios de precisão, os valores de concentração (média \pm desvio padrão) e respetivos desvios-padrão relativos estão apresentados no **ANEXO VII**.

Nas **Tabelas 15** e **16** estão apresentados os resultados obtidos nos estudos de precisão, em termos de intervalo de valores do desvio padrão relativo.

Capítulo 3 . Apresentação e Discussão dos Resultados

Tabela 15 É Desvio padrão relativo (%) de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermédia (RSD_R) obtidos nos ensaios de precisão para os ácidos benzoico e sórbico e acessulfame-k.

| Amostra | Ácido Benzoico | | Ácido Sórbico | | Acessulfame-K | |
|--|----------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | RSD_r (%) | RSD_R (%) | RSD_r (%) | RSD_R (%) | RSD_r (%) | RSD_R (%) |
| Refrigerantes | 0,4 a 2,8 | 1,3 a 3,0 | 0,5 a 3,7 | 4,4 a 5,5 | 0,4 a 2,0 | 2,5 a 3,8 |
| Derivados do Leite | - | - | 1,3 a 1,6 | 3,0 | 0,6 a 1,6 | 1,3 |
| Marmeladas | 0,8 a 2,6 | 2,8 a 3,4 | 1,0 a 3,3 | 2,2 a 7,2 | - | - |
| Molhos (emulsionados e não emulsionados) | 0,3 a 1,4 | 2,7 | 0,7 a 4,0 | 1,6 a 5,2 | - | - |
| Produtos de Panificação | - | - | 1,4 a 4,5 | 6,5 | - | - |
| Produtos de Pastelaria | 0,8 a 4,0 | 2,9 | 0,4 a 3,6 | 2,3 | - | - |

Tabela 16 - Desvio padrão relativo (%) de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermédia (RSD_R) obtidos nos ensaios de precisão para o aspartame, sacarina e cafeína.

| Amostra | Aspartame | | Sacarina | | Cafeína | |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | RSD_r (%) | RSD_R (%) | RSD_r (%) | RSD_R (%) | RSD_r (%) | RSD_R (%) |
| Refrigerantes | 0,7 a 4,1 | 1,7 a 5,2 | 0,4 a 0,7 | 5,9 | 0,5 a 1,4 | 3,3 |
| Derivados do Leite | 1,2 a 4,3 | 3,3 | - | - | - | - |

Os resultados mostraram que o método foi preciso para as diversas matrizes alimentares analisadas, tendo-se atingido um RSD máximo de 4,5% para a repetibilidade e 7,2% para a precisão intermédia. O Guia de Controlo de Qualidade interno do INSA indica que o valor do RSD nos ensaios de repetibilidade e precisão intermédia deve ser no máximo 5%, no entanto, decidiu-se aumentar este limite até 10%, devido à complexidade de algumas amostras. É de realçar que estes resultados traduzem a variabilidade das concentrações obtidas nos vários ensaios, sendo maior na quantificação do ácido sórbico, possivelmente por questões de solubilidade do analito na amostra [98].

De acordo com a **Tabela 15**, observa-se que o maior RSD nos ensaios de repetibilidade diz respeito à análise das marmeladas. Nestes ensaios foram analisadas duas marmeladas que receberam um diferente pré-tratamento. A marmelada A5 foi submetida a uma etapa de homogeneização em almofariz no momento da preparação da amostra. Por sua vez, a marmelada A7 foi totalmente homogeneizada no *GRINDOMIX GM 200*, antes de ter sido realizado qualquer ensaio. Observando a **Tabela 29** do **Anexo VII** foi notório o efeito da etapa de homogeneização na variação da concentração de ácido sórbico, tendo-se conseguido reduzir o RSD da precisão intermédia de 7,2% para 2,2%. Este comportamento também se verificou na quantificação do ácido benzoico.

Estes resultados permitiram comprovar a precisão do método para os vários analitos não só nas diferentes tomas de amostra realizadas no mesmo dia, como, também, em dias diferentes.

3.1.8. Exatidão

Para avaliar a **exatidão** do método utilizado e descrito na norma EN 12856, participou-se em dois ensaios interlaboratoriais. Estes consistiram na análise de dois Testes FAPAS, uma coca-cola (FAPAS 03115) contendo ácido benzoico, acessulfame-K, sacarina e cafeína e, uma geleia (FAPAS 20109) contendo ambos os conservantes. Cada participante recebeu as amostras e analisou-as com os respetivos métodos implementados no laboratório.

A análise das duas amostras consistiu na preparação de três soluções contendo a amostra, uma das quais foi fortificada com os analitos em estudo para determinação das taxas de recuperação (ver **Figura 8**).

Os resultados da análise às duas amostras em termos de concentração dos analitos e taxas de recuperação encontram-se na **Tabela 17**.

Tabela 17 É Volume de solução stock adicionado à solução fortificada (mL), concentração do analito na amostra (mg/kg ou mg/L) e respetivas taxas de recuperação (%).

| Nº Amostra | Descrição | Analito | Volume (mL) | Concentração (mg/kg ou mg/L) | Recuperação (%) |
|------------|--------------------------|----------------|-------------|------------------------------|-----------------|
| 339734 | FAPAS 03115 (Cola Drink) | Acessulfame-K | 1,8 | 81 | 93 |
| | | Sacarina | 0,4 | 34 | 106 |
| | | Cafeína | 0,4 | 89 | 98 |
| | | Ácido Benzoico | 1,5 | 139 | 92 |
| 341145 | FAPAS 20109 (Jam) | Ácido Benzoico | 1,0 | 258 | 95 |
| | | Ácido Sórbico | 1,0 | 187 | 95 |

Atendendo aos resultados expostos, em cima, pode-se concluir que foram obtidas taxas de recuperação aceitáveis, uma vez que estas se encontram dentro do intervalo de 80 a 120% tal como descrito nas normas do Controlo de Qualidade Interno do INSA [98].

A entidade reguladora do ensaio interlaboratorial analisou estatisticamente todos os resultados submetidos e determinou o valor de concentração certificado, bem como o desvio padrão. Estes parâmetros são, de acordo com a **Equação 1.14**, essenciais para a determinação do fator z-score (**Tabela 18**).

Tabela 18 É Valores da concentração experimental e teórica (em mg/kg ou mg/L), do desvio padrão e respetivo z-score, obtidos nos ensaios interlaboratoriais (03115 e 20109) regulados pelo FAPAS.

| Nº Amostra | Descrição | Analito | Teor (mg/kg ou mg/L) | | Desvio padrão (S) | z-score |
|------------|--------------------------|----------------|----------------------|-------------|-------------------|---------|
| | | | Experimental | Certificado | | |
| 339734 | FAPAS 03115 (Cola Drink) | Acessulfame-K | 81 | 85 | 6,98 | -0,66 |
| | | Sacarina | 34 | 31 | 3,29 | 0,77 |
| | | Cafeína | 89 | 94 | 7,59 | -0,66 |
| | | Ácido Benzoico | 139 | 140 | 10,6 | -0,05 |
| 341145 | FAPAS 20109 (Jam) | Ácido Benzoico | 258 | 253 | 17,6 | 0,29 |
| | | Ácido Sórbico | 187 | 203 | 14,6 | -1,11 |

Atendendo a que os valores de z-score estão compreendidos no intervalo de -2 a 2 pode concluir-se que os resultados obtidos na análise dos dois materiais de referência foram bastante satisfatórios.

Confirma-se assim que o método é exato para a determinação e quantificação dos ácidos benzoico e sórbico, que são objeto de validação e, também no que se refere à quantificação dos edulcorantes para os quais o método já foi validado.

3.1.9. Estimativa da incerteza dos resultados

Para finalizar o processo de validação do método, procedeu-se à quantificação da incerteza combinada expandida a partir das incertezas associadas à precisão e à exatidão.

Tal como descrito no subcapítulo 1.4.2 (j) as incertezas do método foram determinadas com base nos resultados obtidos para a precisão intermédia e exatidão, utilizando as **Equações 1.15, 1.16 e 1.17**, respetivamente. Os resultados respeitantes ao cálculo das incertezas a partir da exatidão e precisão intermédia estão presentes nas **Tabelas 19 e 20**, respetivamente.

Tabela 19 É Valores de incerteza padrão $u(\overline{R_m})$ (em mg/kg ou mg/L) determinados a partir dos resultados dos Ensaio FAPAS.

| Descrição | Analito | Concentração (mg/kg ou mg/L) | | | | Desvio padrão (S_{obs}) | Recuperação Média do Método ($\overline{R_m}$) | Incerteza (mg/kg ou mg/L) $u(C_{MRC})$ | Incerteza padrão (mg/kg ou mg/L) $u(\overline{R_m})$ |
|--------------------------|--------------|------------------------------|----------|---------------------|---------------------------|-----------------------------|--|--|--|
| | | Ensaio 1 | Ensaio 2 | Média (C_{obs}) | Certificado (C_{MRC}) | | | | |
| FAPAS 03115 (Cola Drink) | Ác. Benzoico | 139 | 140 | 139 | 140 | 0,55 | 1,00 | 1,04 | 0,0079 |
| FAPAS 20109 (Jam) | Ác. Benzoico | 254 | 252 | 258 | 253 | 4,15 | 1,02 | 1,64 | 0,0133 |
| | Ác. Sórbico | 190 | 183 | 187 | 203 | 2,33 | 0,92 | 1,31 | 0,0101 |

Tabela 20 Valores de incerteza associada à precisão, $u_{\text{precisão}}$ (mg/kg ou mg/L), com base nos resultados dos ensaios de Precisão Intermédia.

| Amostra | Analito | Teor médio (mg/kg ou mg/L) | $\sum_{k=1}^{18} (y_{jk} - \bar{y}_k)^2$ | Desvio padrão ($S_{\text{precisão}}$) | Incerteza (mg/kg ou mg/L) ($u_{\text{precisão}}$) |
|---|----------------|----------------------------------|--|--|--|
| Refrigerantes | | | | | |
| A2 | Ácido Benzoico | 116 | 206,46 | 3,485 | 0,030 |
| | Ácido Sórbico | 116 | 678,90 | 6,319 | 0,055 |
| A19 | Ácido Benzoico | 146 | 60,96 | 1,894 | 0,013 |
| A21 | Ácido Benzoico | 107 | 169,08 | 3,154 | 0,029 |
| | Ácido Sórbico | 99 | 326,15 | 4,380 | 0,044 |
| Produtos derivados do leite | | | | | |
| A13 | Ácido Sórbico | 108 | 177,91 | 3,235 | 0,030 |
| Marmeladas | | | | | |
| A5 | Ácido Benzoico | 334 | 8279,97 | 22,069 | 0,066 |
| | Ácido Sórbico | 357 | 22510,49 | 36,389 | 0,102 |
| A7 | Ácido Benzoico | 617 | 5124,42 | 17,362 | 0,028 |
| | Ácido Sórbico | 386 | 1215,80 | 8,457 | 0,022 |
| Molhos (emulsionados e não-emulsionados) | | | | | |
| A14 | Ácido Benzoico | 388 | 1819,81 | 10,346 | 0,027 |
| | Ácido Sórbico | 301 | 435,26 | 5,060 | 0,017 |
| A15 | | 649 | 19207,90 | 33,614 | 0,052 |
| A16 | Ácido Sórbico | 69 | 17691,89 | 32,260 | 0,047 |
| A22 | | 1252 | 6731,33 | 19,899 | 0,016 |
| Produtos de Panificação | | | | | |
| A18 | Ácido Sórbico | 1285 | 119106,10 | 83,703 | 0,065 |
| Produtos de Pastelaria | | | | | |
| A23 | Ácido Benzoico | 105 | 162,87 | 3,095 | 0,029 |
| | Ácido Sórbico | 176 | 278,12 | 4,045 | 0,023 |

Na **Figura 15** estão representados, graficamente, os resultados relativos à incerteza associada à precisão.

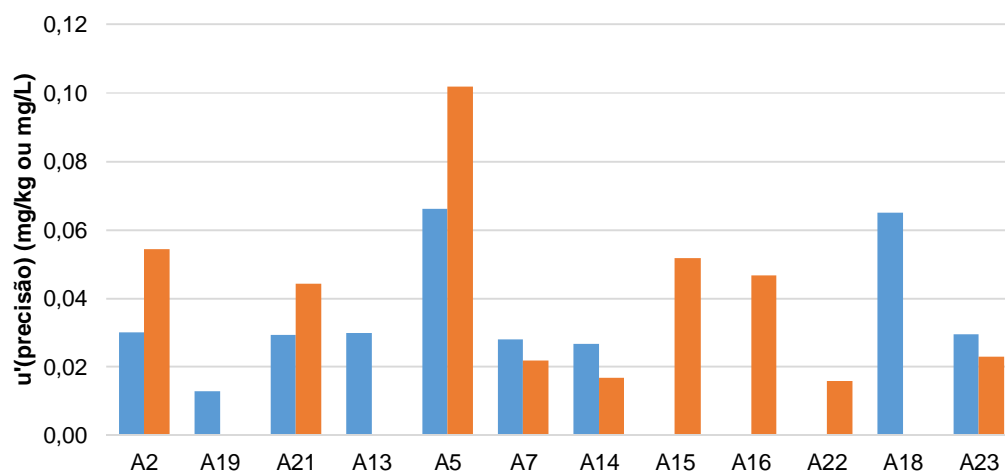


Figura 15 Ë Valores de incerteza associada à precisão (em mg/kg ou mg/L) relativos aos resultados obtidos para o **ácido benzoico** e **ácido sórbico** durante os ensaios de Precisão Intermédia. (Legenda: A2, A19 e A21 Ë refrigerantes; A13 Ë iogurte; A5 e A7 Ë marmeladas; A14, A15, A16 e A22 Ë molhos emulsionados e não-emulsionados; A18 Ë produto de panificação e A23 Ë produto de pastelaria).

Atendendo aos resultados presentes nas **Figura 15** e **Tabela 20** observa-se uma maior incerteza relativamente à quantificação do ácido sórbico.

A **Figura 15** mostra ainda que, em relação à Amostra 5, os resultados estão afetados por uma incerteza superior a 10%. Esta e a Amostra 7 são marmeladas que receberam diferentes pré-tratamentos. Mais uma vez, é notório o efeito das diferentes formas de homogeneização na variabilidade dos resultados.

Com os valores de incerteza associada à exatidão do método e da incerteza associada à precisão intermédia, determinou-se a **incerteza combinada expandida**, com base na **Equação 1.18**, considerando-se um intervalo de confiança de 95% e um fator de expansão y igual a 2. Os resultados estão expressos na **Tabela 21**.

Tabela 21 Ë Incerteza combinada expandida (%) associada à quantificação de ácido benzoico e ácido sórbico.

| Amostra | Incerteza (mg/kg ou mg/L) | | Incerteza Combinada Expandida (mg/kg ou mg/L) | |
|--|------------------------------|---------------|---|---------------|
| | $\bar{u}'_{\text{precisão}}$ | | Ácido Benzoico | Ácido Sórbico |
| | Ácido Benzoico | Ácido Sórbico | Ácido Benzoico | Ácido Sórbico |
| Refrigerantes | 0,024 | 0,049 | 0,051 | 0,101 |
| Derivados do leite | - | 0,030 | - | 0,063 |
| Marmeladas | 0,047 | 0,022* | 0,096 | 0,048 |
| Molhos | 0,027 | 0,033 | 0,056 | 0,069 |
| Produtos de Panificação | - | 0,065 | - | 0,132 |
| Produtos de Pastelaria | 0,029 | 0,023 | 0,061 | 0,050 |
| Incerteza Combinada Expandida Média (%) | | | 7% | 8% |

*Não foi considerada a incerteza associada à precisão obtida para a marmelada A5

O valor da incerteza combinada expandida foi de 7 % para o ácido benzoico e de 8 % para o ácido sórbico.

3.2. Análise das amostras

Terminada a validação do método analítico, procedeu-se à análise das diversas amostras objeto deste estudo.

Foram analisadas 21 amostras de diferentes matrizes alimentares (ver **Tabela 4**), de acordo com o procedimento experimental descrito na norma EN 12856 (ver **Capítulo 2**). No **ANEXO VIII** estão apresentados os vários cromatogramas obtidos.

A análise das várias amostras consistiu num ensaio em triplicado, em que na terceira toma foi adicionado um volume de solução padrão *stock*. A quantidade adicionada a cada amostra foi, em alguns casos, igual a 100% do teor do analito na toma de amostra pesada/pipetada, pois já se conhecia previamente o teor destas (ensaio de repetibilidade) e, noutros casos, a 50% do limite imposto pela legislação para uma determinada matriz alimentar. A partir destes três ensaios foi possível calcular a respetiva taxa de recuperação. Os resultados obtidos no *software* do sistema cromatográfico foram introduzidos na folha de cálculo apresentada no **ANEXO IX**.

Nas **Tabelas 22 e 23** estão apresentados o teor médio em mg/kg, para amostras sólidas, e mg/L, para amostras líquidas, bem como o volume de solução *stock* adicionado à amostra fortificada nos ensaios de recuperação. De acordo com a norma ISO 5725-6:1994 é necessário um coeficiente de variação de repetibilidade máximo de 5% para a aceitação dos resultados com a amostra sem adição de padrão (duplicado).

Capítulo 3 . Apresentação e Discussão dos Resultados

Tabela 22 \ddot{E} Teor (em mg/kg ou mg/L) de ácido benzoico, ácido sórbico, aspartame, acessulfame-k, sacarina e cafeína determinados nas amostras analisadas e, volume de solução stock (1mg/mL) adicionado às amostras fortificadas para os ensaios de recuperação e respectivas taxas de recuperação.

| Amostra | Descrição | Aditivo | Solução Stock (mL) | Concentração (mg/kg ou mg/L) | Recuperação (%) |
|---------------|------------------------------------|----------------|--------------------|------------------------------|-----------------|
| Refrigerantes | | | | | |
| A1 | Marca 1 (Sumo de Ananás) | Acessulfame-K | 1,8 | 43 | 103 |
| | | Aspartame | 3,1 | 36 | 96 |
| | | Ácido Benzoico | 1,1 | 114 | 100 |
| | | Ácido Sórbico | 1,3 | 123 | 106 |
| A2 | Marca 1 (Sumo de Laranja/Maracujá) | Acessulfame-K | 1,8 | 35 | 106 |
| | | Aspartame | 3,1 | 67 | 97 |
| | | Ácido Benzoico | 1,2 | 118 | 105 |
| | | Ácido Sórbico | 1,4 | 116 | 116 |
| A3 | Marca 1 (Sumo de Limão) | Acessulfame-K | 1,8 | 9 | 103 |
| | | Aspartame | 3,1 | 22 | 96 |
| | | Ácido Benzoico | 0,9 | 94 | 102 |
| | | Ácido Sórbico | 1,1 | 105 | 105 |
| A19 | Marca 2 (Cola Light) | Acessulfame-K | 0,9 | 79 | 99 |
| | | Aspartame | 2,4 | 191 | 74 |
| | | Cafeína | 2,0 | 110 | 90 |
| | | Ácido Benzoico | 1,5 | 145 | 99 |
| A20 | Marca 3 (Sumo de Laranja c/gás) | Acessulfame-K | 1,8 | 104 | 93 |
| | | Aspartame | 3,0 | 60 | 79 |
| | | Ácido Sórbico | 1,5 | 161 | 93 |
| A21 | Marca Branca (Sumo de Laranja) | Acessulfame-K | 0,6 | 47 | 109 |
| | | Aspartame | 0,3 | 16 | 92 |
| | | Sacarina | 0,7 | 56 | 101 |
| | | Ácido Benzoico | 1,2 | 106 | 101 |
| | | Ácido Sórbico | 1,1 | 91 | 105 |
| Marmeladas | | | | | |
| A4 | Marca 1 | Ácido Benzoico | 3,6 | 338 | 91 |
| | | Ácido Sórbico | 3,7 | 342 | 98 |
| A5 | Marca branca 1 | Ácido Benzoico | 3,6 | 341 | 97 |
| | | Ácido Sórbico | 4,1 | 405 | 97 |
| A7 | Marca 2 | Ácido Benzoico | 6,1 | 629 | 98 |
| | | Ácido Sórbico | 4,0 | 391 | 99 |
| A8 | Marca 3 (260g) | Ácido Benzoico | 2,5 | 824 | - |
| A9 | Marca 3 (450g) | Ácido Benzoico | 2,5 | 642 | - |
| A12 | Marca branca 2 | Acessulfame-K | 2,5 | 27 | 99 |
| | | Aspartame | 2,5 | 90 | 80 |
| | | Ácido Benzoico | 2,5 | 550 | 93 |
| | | Ácido Sórbico | 5,0 | 491 | 103 |

Capítulo 3 . Apresentação e Discussão dos Resultados

Tabela 23 - Teor (em mg/kg ou mg/L) de ácido benzoico, ácido sórbico, aspartame, acessulfame-k, determinados nas amostras analisadas e, volume de solução stock (1mg/mL) adicionado às amostras fortificadas para os ensaios de recuperação e respectivas taxas de recuperação (continuação).

| Amostra | Descrição | Aditivo | Volume (mL) | Concentração (mg/kg e mg/L) | Recuperação (%) |
|--|-----------------------------|----------------|-------------|-----------------------------|-----------------|
| Derivados do leite | | | | | |
| A6 | Iogurte Pêssego e Chá Verde | Acessulfame-K | 1,8 | 197 | 97 |
| | | Aspartame | 3,1 | 238 | 102 |
| | | Ácido Sórbico | 1,2 | 117 | 103 |
| A13 | Iogurte Maçã e Ananás | Acessulfame-K | 1,8 | 146 | 96 |
| | | Aspartame | 3,1 | 131 | 86 |
| | | Ácido Sórbico | 1,2 | 97 | 91 |
| Molhos (emulsionados e não-emulsionados) | | | | | |
| A14 | Ketchup (Marca 1) | Ácido Benzoico | 5,2 | 394 | 100 |
| | | Ácido Sórbico | 5,1 | 304 | 97 |
| A15 | Ketchup (Marca 2) | | 5,1 | 641 | 100 |
| A16 | Maionese Light (Marca 1) | Ácido Sórbico | 5,2 | 675 | 97 |
| A17 | Maionese (Marca 2) | | 5,1 | 619 | 90 |
| A22 | Margarina Líquida | | 12,6 | 1217 | 111 |
| Produtos de Panificação | | | | | |
| A18 | Pão em fatias | Ácido Sórbico | 10,1 | 1298 | 88 |
| Produtos de Pastelaria | | | | | |
| A23 | Bolo com doce de ovos | Ácido Benzoico | 1,1 | 105 | 93 |
| | | Ácido Sórbico | 1,8 | 175 | 93 |

Nas **Figuras 16 e 17**, apresentam-se gráficos de barras que traduzem os resultados experimentais obtidos na análise dos diferentes aditivos nas várias amostras e que permitem uma melhor observação sobre a variação da concentração dos conservantes e edulcorantes em estudo nas diferentes matrizes.

De realçar que a legislação sobre a rotulagem apenas obriga os fabricantes a indicarem quais os aditivos presentes no alimento e a sua classe (conservante, edulcorante, etc.), não sendo obrigatória a indicação do teor percentual de cada um destes aditivos. Deste modo, não foi possível quantificar quaisquer desvios em relação aos teores determinados.

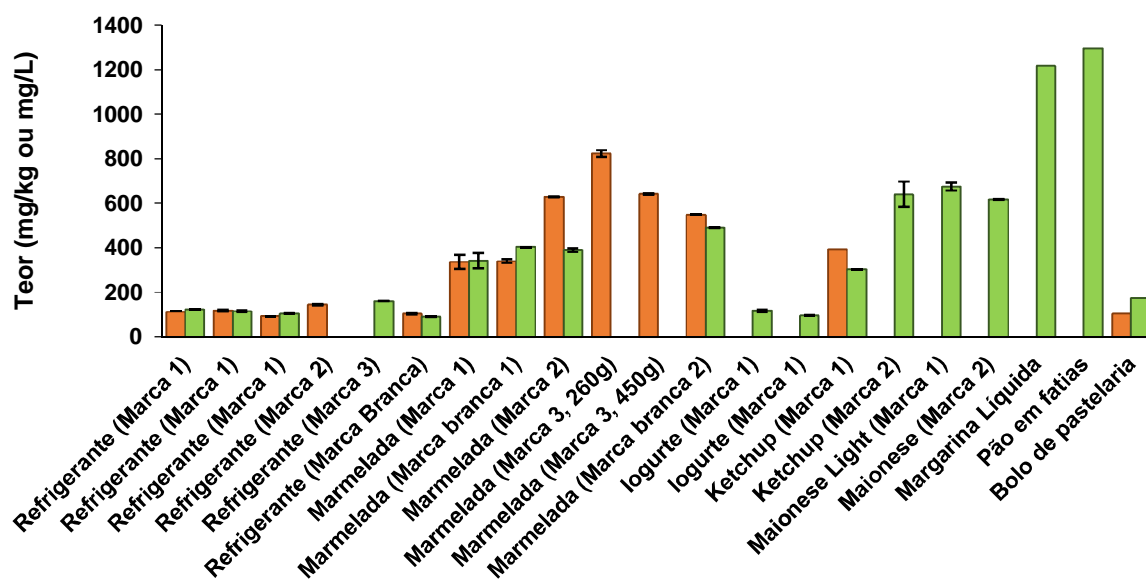


Figura 16 É Concentração (mg/kg ou mg/L) de **Ácido Benzoico** e **Ácido Sórbico** obtido na análise das amostras.

Relativamente à quantificação dos conservantes, não se verificaram desvios significativos quanto ao teor legislado para cada tipo de matriz alimentar. Verificou-se também que o ácido sórbico é o conservante preferencialmente usado pelos fabricantes.

O teor de ácido sórbico e ácido benzoico nas amostras variou entre 91 mg/L e 1298 mg/kg o qual foi encontrado num refrigerante de marca branca e em pão fatiado, respetivamente. Quanto à concentração de ácido benzoico oscilou entre 94 mg/L e 824 mg/kg no refrigerante de marca 1 e na marmelada de marca 3, respetivamente.

Os refrigerantes possuem menores concentrações quer de ácido benzoico como de ácido sórbico devido à acidez destes produtos a qual deverá resultar da utilização de reguladores de acidez (ex: ácido cítrico) que impossibilitam o crescimento de bactérias. Nas amostras de refrigerantes que foram analisadas confirmou-se a presença de ambos os conservantes em 67% das amostras e, determinou-se uma gama de concentrações de 94 a 145 mg/L para o ácido benzoico, e de 91 a 161 mg/L para o ácido sórbico. Para qualquer uma das amostras de refrigerantes analisadas não foram verificados incumprimentos aos limites máximos permitidos de 300 mg/L para o ácido sórbico e 150 mg/L para o ácido benzoico e, de 250+150 mg/L se ambos os analitos estiverem presentes na matriz [23].

Nas duas amostras de iogurtes foram detetadas concentrações de ácido sórbico e de ácido benzoico, embora o último em concentrações vestigiais, semelhantes às observadas para os refrigerantes, e inferiores ao limite de 300 mg/L para os dois conservantes em simultâneo [23].

Capítulo 3 . Apresentação e Discussão dos Resultados

Por sua vez, amostras como as marmeladas, os molhos e o pão necessitam de maiores quantidades destes conservantes. A complexidade destas amostras resulta numa grande necessidade de usar os conservantes não só para impedir o crescimento microbiano mas, sobretudo, para estabilizar a própria estrutura do alimento, como é o caso das emulsões ou do pão e, assim, garantir que estes mantenham características que os tornem agradáveis aos consumidores durante mais tempo.

De facto, foi nas amostras de marmeladas que se observou uma grande variabilidade no que diz respeito ao teor de ácido benzoico. *Ferreira et al.*, 2000, realizou um estudo similar onde otimizou um método para a quantificação simultânea de ácido benzoico e ácido sórbico e, aplicou-o à análise de 11 amostras de marmeladas. Comparando os resultados verificou-se que os obtidos neste trabalho se encontram dentro da gama de concentrações determinada, por *Ferreira et al.* o qual também observou uma grande heterogeneidade nos valores, constatando-se assim que o conteúdo em conservantes pode variar consoante o fabricante, embora, sem ultrapassar o limite máximo permitido de 1500 mg/kg de ácido sórbico e benzoico em simultâneo [24,44].

No que diz respeito aos molhos, apenas o ketchup da marca 1 contém ambos os conservantes, no entanto, a concentração total de ambos é aproximadamente igual ao teor de ácido sórbico observado para o ketchup de marca 2. *Nour et al.*, 2007, realizou um estudo que envolveu o método descrito na norma EN 12856 e aplicou-o à análise de amostras de molho de tomate e ketchup, tendo determinado um teor de ácido benzoico de 509,5 mg/kg de amostra [29]. Tal como verificado para as restantes amostras, não houve incumprimento dos limites máximos permitidos de 1000 mg/kg para o ácido benzoico nos molhos não-emulsionados (ex: ketchup) e de 2000 mg/kg para o ácido sórbico, no que diz respeito aos restantes molhos (maionese e margarina) [23].

Foi na amostra de pão em fatias que se detetou a presença de ácido sórbico em maior concentração, igual a 1298 mg/kg, mas inferior ao limite de 2000 mg/kg imposto pela legislação. Por sua vez, o bolo de pastelaria revelou concentrações reduzidas de ambos os conservantes, comparativamente à amostra de pão, também inferiores ao limite de 1500 mg/kg de ácido benzoico e ácido sórbico, em simultâneo, referido na legislação [23].

No que se refere à análise das amostras contendo edulcorantes, observou-se a predominância destes aditivos em sumos e iogurtes sendo o conteúdo em adoçantes variável entre as diversas marcas de refrigerantes (**Figura 17**).

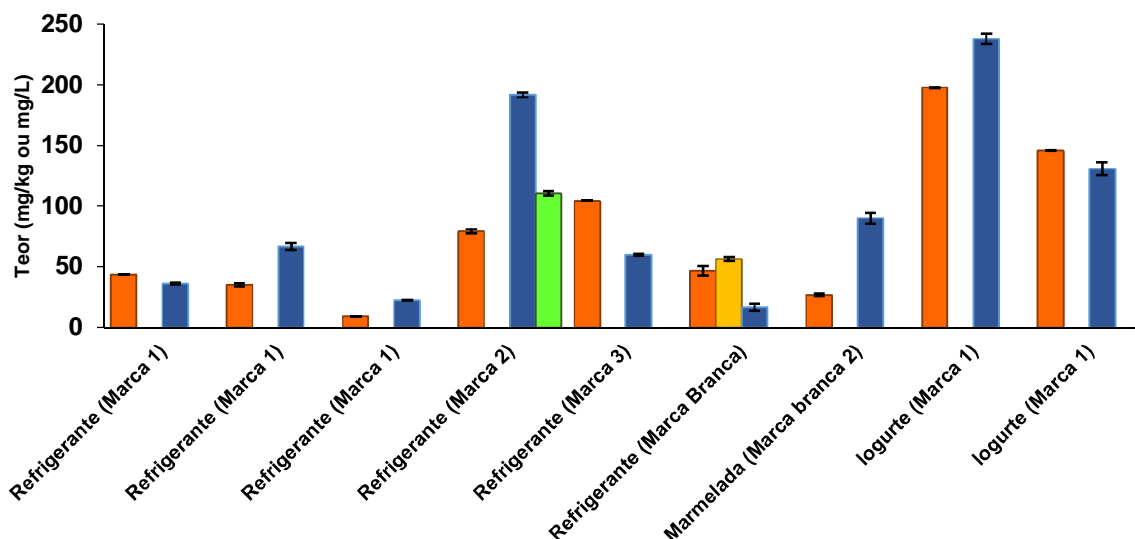


Figura 17 - Teor experimental (mg/kg ou mg/L) de Acesulfame-K, Aspartame, Sacarina e Cafeína obtido na análise das amostras.

Os edulcorantes intensos como o acessulfame-K e o aspartame estão presentes em todas as amostras de refrigerantes que foram analisadas e foi ainda detetada a presença de sacarina numa amostra de refrigerante de marca branca. Esta mesma amostra indica no rótulo a presença de ciclamato que não foi possível comprovar uma vez que este edulcorante não pode ser quantificado pelo presente método.

O aspartame revelou ser o edulcorante mais usado neste tipo de amostras estando presente numa gama de concentrações de 17 a 238 mg/L, seguindo-se o acessulfame-k com teores desde 9 até 197 mg/L.

De todas as amostras de refrigerantes, a marca 3 é a que possui menor concentração de aspartame, possivelmente, por ter na sua constituição outros edulcorantes intensos, nomeadamente, o acessulfame-K, a sacarina e o ciclamato.

Ao contrário do que se observou para os conservantes, as amostras de iogurte revelaram concentrações de edulcorantes intensos superiores às registadas para os refrigerantes, 146 a 197 mg/L para o acessulfame-K e 131 a 238 mg/L para o aspartame.

Houve ainda o caso particular de uma marmelada de marca branca na qual foi detetada a presença de aspartame e acessulfame-K. Neste caso, não existia qualquer indicação no rótulo pelo que foi feito um ensaio de fortificação para comprovar a veracidade dos resultados tendo-se observado um aumento da área dos picos no cromatogramas relativo à amostra fortificada, e uma taxa de recuperação de 99 %, para o acessulfame-K, e de 80 % para o aspartame.

Por último, foi detetada a presença de cafeína num refrigerante com uma concentração de 110 mg/L, inferior ao limite máximo permitido de 150 mg/L [99].

Os resultados obtidos quer para os conservantes quer para os edulcorantes intensos e cafeína nos sumos de fruta e refrigerantes foram semelhantes a estudos realizados em Portugal por Lino *et al.*, 2008 e Diogo *et al.*, 2013, e a um estudo realizado nos Estados Unidos da América por Ree & Stoa, 2011 [100-102].

Em nenhuma das amostras analisadas foram ultrapassados os limites máximos permitidos de 350 mg/L para o acessulfame-K, 600 mg/L para o aspartame e de 80 mg/L para a sacarina, no caso dos iogurtes e refrigerantes e, de 1000 mg/kg para o acessulfame-K ou aspartame, no caso das marmeladas [23].

3.3. Estabilidade das soluções padrão

Por vezes, o(s) analito(s) em estudo são espécies bastante instáveis, sendo necessário a preparação de uma curva de calibração ~~% fresca~~ a cada nova análise. Assim, toma-se essencial a realização de testes para avaliar, por exemplo, a estabilidade do analito na amostra após ciclos de congelamento e descongelamento, a estabilidade das soluções-padrão, e a estabilidade do analito a curto e/ou a longo prazo [103,104].

Neste trabalho foi avaliada a estabilidade das soluções-padrão, para verificar a necessidade ou não de preparar novas soluções a cada novo ensaio. Este estudo consistiu em três injeções de cada uma das soluções-padrão contendo os conservantes ácido benzoico e ácido sórbico, e os edulcorantes acessulfame-K e aspartame, em diferentes períodos de tempo.

A partir das soluções-padrão foram preparados três conjuntos de seis *vials*, em que cada conjunto representa uma curva de calibração. As soluções do primeiro conjunto de *vials* foram analisadas no próprio dia (Dia 0) e as restantes foram injetadas após um (Mês 1) e dois meses (Mês 2), respetivamente. No período de tempo entre análises, as soluções-padrão foram armazenadas na câmara frigorífica a uma temperatura de $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Nas **Figuras 18, 19, 20 e 21**, estão representadas as curvas de calibração para os quatro analitos nos três ensaios de estabilidade.

Capítulo 3 . Apresentação e Discussão dos Resultados

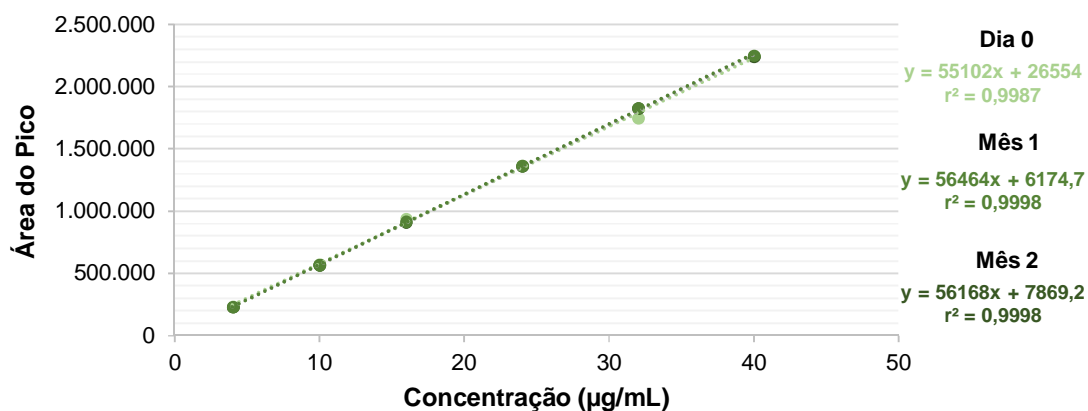


Figura 18 É Curvas de calibração para o acessulfame-K nos ensaios de estabilidade.

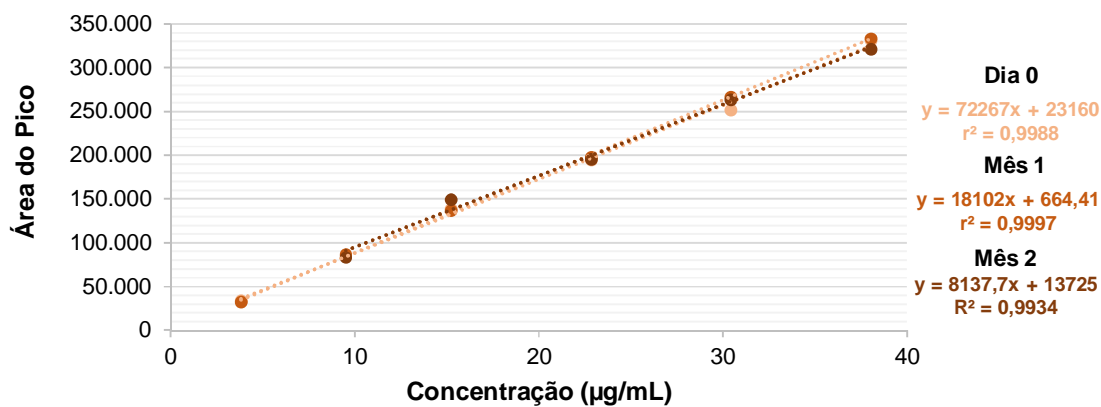


Figura 19 - Curvas de calibração para o aspartame nos ensaios de estabilidade.

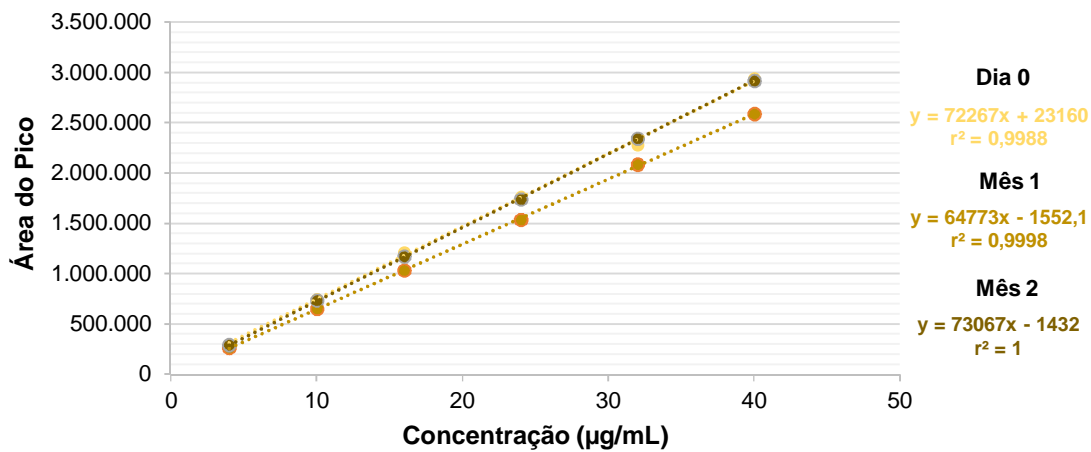


Figura 20 - Curvas de calibração para o ácido benzoico nos ensaios de estabilidade.

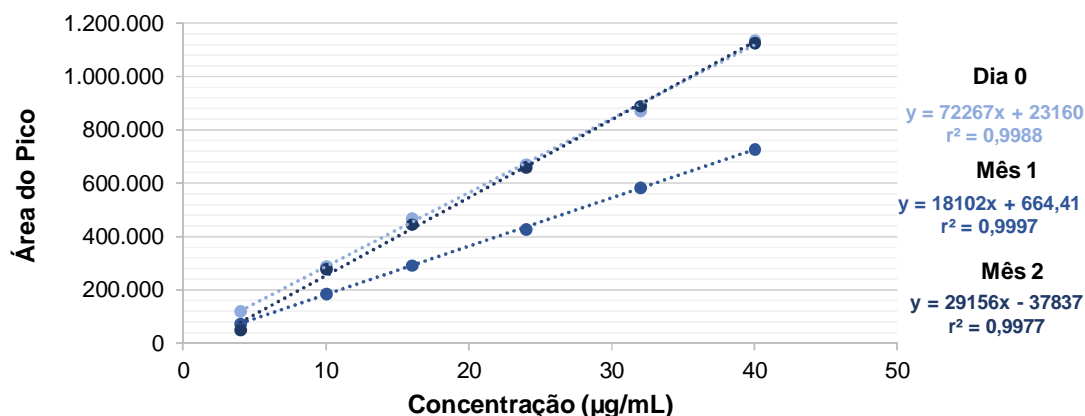


Figura 21 - Curvas de calibração para o ácido sórbico nos ensaios de estabilidade

Observou-se que o declive das curvas de calibração foi aproximadamente constante para os três ensaios, com exceção do ácido sórbico em que se verificou uma maior variação.

É ainda de realçar as diferenças na curva de calibração dos ácidos benzoico e sórbico no ensaio realizado no Dia 1. Esta anomalia deveu-se a problemas com a coluna de cromatografia, que se traduziu num arrastamento dos picos, ou *%tailing*+, e que comprometeu a resolução dos dois picos, como se pode ver na **Figura 22**.

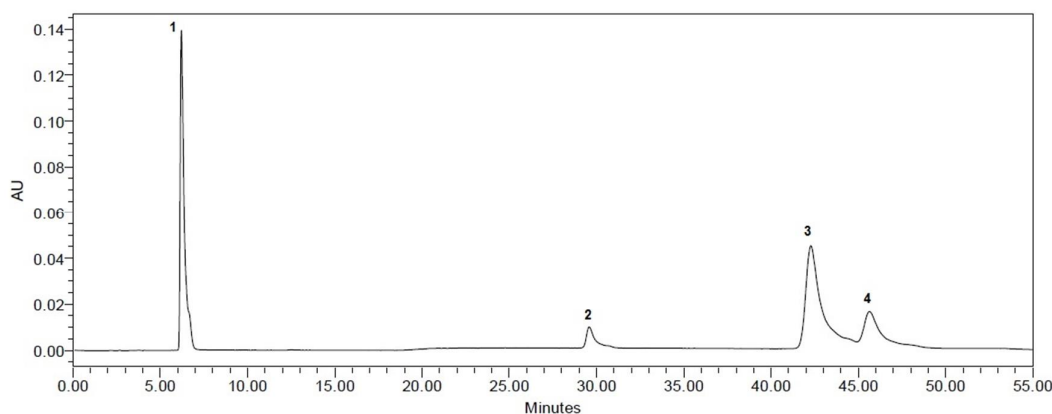


Figura 22 É Cromatograma da solução padrão de calibração (40 µg/mL), contendo 1 - acessulfame-K ($t_r=6,28$ min), 2 - aspartame ($t_r= 29,63$ min), 3 - ácido benzoico ($t_r= 42,29$ min) e 4 - ácido sórbico ($t_r= 45,75$ min), injetada 1 mês após a preparação.

Nos meses 1 e 2 deste estudo foram preparadas e analisadas novas soluções padrão que funcionaram como valores de referência para a determinação do desvio percentual entre ambas as soluções (**Tabela 24**) e, assim, comprovar a utilidade das soluções padrão em períodos prolongados de tempo. Considerou-se que o desvio entre as soluções padrão frescas e as soluções alvo deste estudo não deve ultrapassar os 5%.

Tabela 24 - Desvio percentual das soluções padrão "de estabilidade" relativamente às soluções padrão "frescas".

| Concentração (µg/mL) | Desvio (%) | | | | | | | |
|-------------------------|---------------|-------|-----------|--------|----------------|-------|---------------|-------|
| | Acessulfame-K | | Aspartame | | Ácido Benzoico | | Ácido Sórbico | |
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 1 | Dia 2 |
| 4 | 3,16 | 1,62 | 7,00 | 100,00 | 11,66 | 1,46 | 32,03 | 57,00 |
| 10 | 2,28 | 1,39 | -0,40 | 1,86 | 11,89 | -0,91 | 29,38 | 3,35 |
| 16 | 1,90 | 2,03 | -3,31 | -9,89 | 10,84 | 3,96 | 30,86 | 5,06 |
| 24 | 0,22 | -0,23 | 1,56 | -2,05 | 15,01 | -0,57 | 32,84 | 2,39 |
| 32 | -0,49 | -0,71 | -1,46 | -2,99 | 11,03 | -2,19 | 31,99 | 1,11 |
| 40 | 0,75 | 2,53 | -2,78 | 0,17 | 11,49 | -0,87 | 31,63 | 1,53 |

Através do desvio percentual determinado para as várias soluções concluiu-se que as soluções padrão com as concentrações 4 µg/mL, 10 µg/mL e 16 µg/mL revelaram maiores desvios face às soluções preparadas no dia e usadas como referência, ultrapassando em alguns casos o limite estipulado de 5%.

Os desvios calculados para as restantes soluções estiveram sempre dentro do limite podendo-se confirmar a estabilidade dos analitos, com exceção dos ensaios do Dia 1 para os ácidos benzoico e sórbico, como foi explicado anteriormente.

Adicionalmente procedeu-se à realização do teste-t emparelhado, com um nível de significância de 5%, para poder avaliar, se as médias obtidas para as áreas dos picos nos ensaios de estabilidade são estatisticamente diferentes daquelas obtidas no dia de preparação das soluções padrão.

O teste-t foi aplicado apenas à solução padrão de maior concentração (40 µg/mL) pois, partiu-se do princípio que, no caso de esta se revelar estável durante todo o tempo de ensaio, então a solução stock (1 mg/mL) também se manterá estável.

No caso do valor de p ser superior ao nível de significância, a hipótese nula não pode ser rejeitada, ou seja, as médias das áreas do pico obtidas no Mês 1 ou no Mês 2 relativamente ao Dia 0 são estatisticamente iguais.

As áreas dos picos para os três ensaios e os resultados do teste-t estão representados na **Tabela 25**.

Tabela 25 É Valores das áreas dos picos cromatográficos relativamente à quantificação dos analitos (acessulfame-K, aspartame, ácido benzoico e ácido sórbico) na solução padrão de calibração (40 µg/mL) e resultados do teste-t emparelhado ($p < 0,05$).

| Analito | Área do Pico | | | <i>p-value</i> | |
|-----------------------|--------------|------------|------------|----------------|-------|
| | Dia 0 | Mês 1 | Mês 2 | Mês 1 | Mês 2 |
| Acessulfame-K | 22450065,02 | 2247424,99 | 2228734,51 | 0,50 | 0,50 |
| | 2245213,50 | 2253471,67 | 2238181,52 | | |
| Aspartame | 330482,50 | 331683,50 | 321116,50 | 0,26 | 0,08 |
| | 331342,00 | 334410,01 | 319146,00 | | |
| Ácido Benzoico | 2946005,19 | 2589653,01 | 2912694,49 | 0,005 | 0,06 |
| | 2940390,06 | 2589359,01 | 2899956,52 | | |
| Ácido Sórbico | 1134011,83 | 725380,83 | 1112257,51 | 0,0001 | 0,04 |
| | 1135216,94 | 726516,30 | 1110368,01 | | |

Atendendo aos resultados obtidos para os valores de p relativamente ao acessulfame-K pode concluir-se que este se manteve estável durante os 2 meses em que se realizaram os ensaios.

Os resultados do $p-value$ para o aspartame e para o ácido benzoico encontram-se bastante próximos do limite, isto é, do nível de significância, contudo, pode afirmar-se que ambos se mantiveram estáveis passados 2 meses da sua preparação. É de realçar que o $p-value$ para o ácido benzoico no Mês 1 não é um resultado real da estabilidade do analito uma vez que nesses ensaios houve problemas com a coluna. A estabilidade da solução padrão de ácido benzoico foi, posteriormente confirmada no Mês 2.

No que diz respeito ao ácido sórbico o $p-value$ obtido passados 2 meses da preparação da solução foi inferior ao nível de significância, pelo que as médias obtidas são estatisticamente diferentes e, como tal, não se pode afirmar a estabilidade do analito. No entanto tal não acontece para a injeção da mesma solução passado 1 mês de ter sido preparada.

Uma vez que se garantiu a estabilidade apenas de algumas das soluções, optou-se por preparar novas soluções padrão a cada novo ensaio.

Para finalizar, considera-se que seria necessário realizar mais ensaios de estabilidade, desta vez, às soluções padrão *stock* para averiguar a estabilidade de cada analito individualmente e perceber se a presença dos conservantes tem algum efeito estabilizador nas estruturas dos outros analitos como, por exemplo, do aspartame que se degrada facilmente.

Capítulo 4

Conclusões e Trabalho futuro

O método de cromatografia líquida de alta eficiência usado neste trabalho revelou ser adequado para a quantificação dos conservantes ácido benzoico e ácido sórbico em diversas matrizes alimentares, tendo apresentado uma linearidade adequada à gama de trabalho em que foi aplicado. Foi ainda possível aplicar o mesmo método para deteção e quantificação de edulcorantes intensos e de cafeína em amostras de refrigerantes.

Os limites de deteção e de quantificação da curva de calibração foram de 1,3 µg/mL e 4 µg/mL, respetivamente, e do método iguais a 6,7 mg/kg (ou mg/L) e 20 mg/kg (ou mg/L) e, revelaram ser adequados para as várias matrizes alimentares analisadas.

A precisão do método foi avaliada através de ensaios de repetibilidade e de precisão intermédia que revelaram desvios padrão relativos inferiores a 5 e 7% respetivamente. Participou-se em dois ensaios interlaboratoriais para avaliar a exatidão do método de análise e os valores de z-score foram satisfatórios para os dois conservantes. No fim, determinou-se que os resultados estão afetados de uma incerteza de 7% para o ácido benzoico e de 8% para o ácido sórbico.

A concentração de ácido sórbico e ácido benzoico nas amostras variou entre 91 . 1298 mg/kg e entre 94 - 824 mg/kg, respetivamente, e a concentração de acessulfame-K e de aspartame foi de 9 . 197 mg/L e 16 . 238 mg/L. Foi ainda detetada a presença de sacarina e de cafeína individualmente em duas amostras com uma concentração de 56 mg/L e 110 mg/L, respetivamente. Verificou-se para todos os casos o cumprimento dos limites máximos permitidos presentes na legislação em vigor.

Na literatura foram identificados alguns estudos que aplicaram métodos semelhantes ao usado neste trabalho para a quantificação dos ácidos sórbico e benzoico em sumos de fruta e refrigerantes, marmeladas e ketchup onde foram obtidos resultados semelhantes e dentro da gama de concentrações observada neste trabalho.

No entanto, existem questões relacionadas com o processo de validação executado e descrito ao longo deste trabalho que devem ser exploradas no futuro. Deve ser realizado um ensaio de recuperação para verificar a adequabilidade dos limites de quantificação e de deteção usados e, deve ser feito um novo estudo de estabilidade mas sobre as soluções padrão *stock*.

Relativamente à temática dos aditivos alimentares verificou-se que existem alguns estudos de avaliação da exposição alimentar aos conservantes e aos edulcorantes intensos, mas apenas em refrigerantes e sumos de fruta. Uma vez que

os conservantes estão frequentemente presentes no nosso dia-a-dia em alimentos como os molhos é importante a realização de estudos de estimativa da ingestão destes aditivos aos restantes géneros alimentícios.

Capítulo 5

Referências Bibliográficas

- [1] Porto A. A., **Contributo para a estimativa da prevalência de edulcorantes intensos num grupo de jovens estudantes em Portugal Continental**, Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2010.
- [2] Food additives_ Reference paper of the European Food Information Council (EUFIC). Eufic Review 06/2008.
- [3] Sargaço B. R., **Otimização e validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para a determinação do edulcorante ciclamato. Ocorrência em adoçantes de mesa**, Tese de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2013.
- [4] Branen A. L., Haggerty R. J., Introduction to Food Additives, in: Branen A. L., Davidson P. M., Salminen S., Thorngate III J. H., Food Additives, 2nd Ed. NY: Marcel Dekker, Inc., 2002
- [5] Pereira E., **Aditivos Alimentares nos Novos Refrigerantes à Base de Água Mineral**, Tese de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2008.
- [6] Diretiva 89/107/CEE do Conselho de 21 de Dezembro de 1988, relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes aos aditivos que podem ser utilizados nos géneros destinados à alimentação humana, Jornal Oficial (L040) de 11 de Fevereiro de 1989.
- [7] Mephram B., *Food Additives: an Ethical Evaluation*, British Medical Bulletin, 99 (2011) 7-23.
- [8] Saltmarsh M., Essential Guide to Food Additives, revised by Emerton V. and Choi E., 3rd Ed., Leatherhead Food International, 2008.
- [9] Verbruggen R., Food Additives in European Union, in: Branen A. L., Davidson P. M., Salminen S., Thorngate J. H., Food Additives, 2nd Ed. NY: Marcel Dekker, Inc., 2002.

- [10] Wood R., Foster L., Damant A., Key P., Analytical Methods for Food Additives, 1st Ed., Woodhead Publishing Ltd. And CRC Press, 2004.
- [11] Gallego M., González M., Food and Nutritional Analysis: Additives, in: Worsfold P., Townshend A., Poole C. (editors) , Encyclopedia of Analytical Science 2nd Ed. ,Elsevier, Oxford, United Kingdom, 2004, Vol. 3, pp. 217-225.
- [12] Decreto.Lei nº 64/2011, Diário da República nº 89 Série I, 09 de Maio de 2011.
- [13] Comissão das Comunidades Europeias, Proposta de Regulamento do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos Aditivos Alimentares (apresentada pela Comissão), COM (2006) 428 final, 2006/0145 (COD), Bruxelas, 28 de Julho de 2006.
- [14] Regulamento da União Europeia nº 1169 do Parlamento europeu e do conselho, Jornal Oficial (L304/18), 25 de Outubro de 2011.
- [15] Diretiva 95/2/CE do Conselho de 20 de fevereiro de 1995, relativa aos aditivos alimentares com exceção dos corantes e edulcorantes, Jornal Oficial (L61) de 18 de Março de 1995.
- [16] Brul S., Coote P., Preservative Agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms, *International Journal of Food Microbiology*, **50** (1999) 1-17.
- [17] Saad B., Bari M. F., Saleh M. I., Ahmad K., Khairuddin M., Talib M., Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **1073** (2005) 393-397.
- [18] Zhao Y., Cai M., Chen X., Pan S., Yao S., Jin M., Analysis of nine food additives in wine by dispersive solid-phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography, *Food Research International*, **52** (2013) 350-358.
- [19] Mota F. J. M., Ferreira I. M. P. L. V. O., Cunha S. C., Beatriz M., Oliveira P. P., Optimisation of extraction procedures for analysis of benzoic and sorbic acids in foodstuffs, *Food Chemistry*, **82** (2003) 469-473.

- [20] Decreto.Lei nº 363/98, Diário da República nº 268 Série I, de 19 de Novembro de 1998.
- [21] Decreto.Lei nº 274/2000, Diário da República nº 259 Série I, de 09 de Novembro de 2000.
- [22] Appendini P., Hotchkiss J. H., Review of Antimicrobial Food Packaging, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **3** (2002) 113 . 126.
- [23] Davidson P. M., Juneja V. K., Branen J. K., Antimicrobial Agents in: Branen A. L., Davidson P. M., Salminen S., Thorngate III J. H. (Eds), Food Additives, 2nd Edition, Marcel Dekker, Inc., 2002, 563-620.
- [24] Mangalassary S., antimicrobials in Food Packaging to Enhance Food Safety:Current Developments and Future Challenges, *Journal of Food Processing & Technology*, **3** (2012) .
- [25] Chipley J. R., Sodium Benzoate and Benzoic Acid in: Davidson P. M., Sofos J. N., Branen A. L. (Eds), Antimicrobials in Food, 3rd Edition, CRC Press, 2005.
- [26] World Health Organization, Benzoic Acid and Sodium Benzoate, Concise International Chemical Assessment Document 26, WHO, Geneva, 2000.
- [27] Marsili N. R., Sobrero M. S., Spectrophotometric determination of sorbic and benzoic acids in fruit juices by a net analyte signal . based method with selection of the wavelength range to avoid non-modelled interferences, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **376** (2003) 126-133.
- [28] Weller P.J., Benzoic Acid Monograph in: R.C. Rowe, P.J. Sheskey, P. J. Weller (Eds.), Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th Edition, Pharmaceutical Press, 2006, 66-68.
- [29] Nour V., Trandafir I., Ionica M. E., Development and evaluation of an HPLC-DAD method for determination of benzoic acid in tomato sauce and ketchup, *Bulletin of*

University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, **63** (2007) 510-515.

- [30] Sieber R., Bütikofer U., Bosset J. O., Benzoic acid as natural compound in cultured dairy products and cheese, *International Dairy Journal*, **5** (1995) 227.
- [31] Mazdeh F. Z., Aftabdari F. E., Moradi-Khatoonabadi, Shaneshin M., Torabi P., Ardekani M. R. S., Hajimahhmoodi M., Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in Iranian doogh, *Food Additives & Contaminants: Part B*, **7** (2014) 115-119.
- [32] White A., Handler P., Smith E. L., Principles of Biochemistry 3rd Ed., McGraw-Hill, New York, 1964.
- [33] Lino C. M., Pena A., Ocurrence of caffein, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment, *Food Chemistry*, **121** (2010) 503-508.
- [34] Stopforth J. D., Sofos J. N., Busta F., F., Sorbic Acid and Sorbates in: Davidson P. M., Sofos J. N., Branen A. L. (Eds), Antimicrobials in Food, 3rd Edition, CRC Press, 2005.
- [35] Lück E., Jager M., Raczek N, "Sorbic Acid" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [36] 4: Final Report on the Safety Assessment of Sorbic Acid and Potassium Sorbate, *International Journal of Toxicology*, **7** (1988) 837-880.
- [37] Tfouni S. A. V., Toledo M. C. F., Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food, *Food Control*, **13** (2002) 117-123.
- [38] Korotkova E. I., Avramchik O. A., Angelov T. M., Karbainov Y. A., Investigation of antioxidante activity and lipophilicity parameterss of some preservatives, *Electrochimica Acta*, **51** (2005) 324-332.

- [39] Pylypiw Jr. H. M., Grether M. T., Rapid High-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate, *Journal of Chromatography A*, **883** (2000) 299-304.
- [40] Can N. O., Arli G., Lafci Y., A novel RP-HPLC method for simultaneous determination of potassium sorbate and sodium benzoate in soft drinks using C18-bonded monolithic silica column, *Journal of Separation Science*, **34** (2011) 2214-2222.
- [41] Polönen I., Silage for Fur Animal, University of Helsinki, Department of Animal Science, Publications.
- [42] Salmond C. V., Kroll R. G., Booth I. R., The Effect of Food Preservatives on pH Homeostasis in *Escherichia coli*, *Journal of General Microbiology*, **130** (1984) 2845-2850.
- [43] Wen Y., Wang Y., Feng Y., A simple and rapid method for simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in food using in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **388** (2007) 1779-1787.
- [44] Ferreira I. M. P. L. V. O., Mendes E., Brito P., Ferreira, M. A., Simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in quince jam by HPLC, *Food Research International*, **33** (2000) 113-117.
- [45] Hannisdal A., Analysis of acesulfame-K, saccharin and preservatives in beverages and jams by HPLC, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, **194** (1992) 517-519.
- [46] Mihyar G. F., Yousif M. A. K., Yamani M. I., Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Labaneh by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Food Composition and Analysis*, **12** (1999) 53-61.
- [47] Dossi N., Toniolo R., Susmel S., Pizzariello A., Bontempelli G., Simultaneous RP-LC Determination of Additives in Soft Drinks, *Chromatographia*, **63** (2006) 557-562.

- [48] Altioikka G., Ergun B., Can N. O., Aboul-Enein H. Y., Validated Reversed Phase HPLC Method for the Analysis of the Food Additive, Sodium Benzoate, in Soft Drinks and Jams, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **30** (2007) 1125-1136.
- [49] Nour V., Trandafir I., Ionica M. E., Quantitative determination of caffeine in carbonated beverages by an HPLC method, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, **14** (2008) 123-127.
- [50] Xiu-Qin L., Chao J., Wei Y., Yun L., Min-Li Y., Xiao-Gang C., UPLC-PDAD Analysis for Simultaneous Determination of Ten Synthetic Preservatives in Foodstuff, *Chromatographia*, **68** (2008) 57-63.
- [51] Trandafir I., Nour V., Ionica M. E., Development and validation of an HPLC method for simultaneous quantification of acesulfame-K, saccharin, aspartame, caffeine and benzoic acid in cola soft drinks, *Scientific Study & Research*, **2** (2009) 185-194.
- [52] Guarino C., Fuselli F., Mantia A. L., Longo L., Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses, *Food Chemistry*, **127** (2011) 1294-1299.
- [53] Ma K., Yang N. Y., Jiang X. X., Zhao M., Cai Y. Q., Simultaneous determination of 20 food additives by high performance liquid chromatography with photo-diode array detector, *Chinese Chemical Letters*, **23** (2012) 492-495.
- [54] Gholipour M., Babai Z., Mohammadi Z., Karimzadeh L., Zadeh M. H. E., Abedi S., Validation Method and Determination of Potassium Sorbate in Iranian Dough with HPLC, *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, **24** (2013) 37-44.
- [55] Yan Q., Yang L., Ma X., Feng H., Simultaneous Determination of Six Food Additives in Drinks by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Diode Array Detector Detection, *Journal of Chemical Society of Pakistan*, **35** (2013) 1060-1065.

- [56] Xiu-Qin L., Chao J., Yan-Yan S., Min-Li Y., Xiao-Gang C., Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS, *Food Chemistry*, **113** (2009) 692-700.
- [57] Chen X., Zhao Y., Shen H., Jin M., Application of dispersive solid-phase extraction and ultra-fast liquid chromatography-tandem quadropole mass spectrometry in food additive residue analysis of red wine, *Journal of Chromatography A*, **1263** (2012) 34-42.
- [58] Jia W., Ling Y., Lin Y., Chang J., Chu X., Analysis of additives in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1336** (2014) 67-75.
- [59] EN 12856, Foodstuffs . Determination of acesulfame-K, aspartame and saccharin . High performance liquid chromatographic method, 1999.
- [60] Dong C., Wang W., Headspace solid-phase microextraction applied to the simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in beverages, *Analytica Chimica Acta*, **562** (2006) 23 . 29.
- [61] Wang L., Zhang X., Wang Y., Wang W., Simultaneous determination of preservatives in soft drinks, yogurts and sauces by a novel solid-phase extraction element and thermal desorption-gas chromatography, *Analytica Chimica Acta*, **577** (2006) 62-67.
- [62] Abedi A., Mohammadi A., Azadniya E., Mortazavian A. M., Khaksar R., Simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in milk products using a n optimised microextraction technique followed by gas chromatography, *Food Additives & Contaminants*, **31** (2014) 21-28.
- [63] Dobiášová Z., Pazourek J., Havel J., Simultaneous determination of trans-reveratrol and sorbic acid in wine by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, **23** (2002) 263-267.
- [64] Han F., He Y., Li L., Fu G. Xie H., Gan W., Determination of benzoic acid and sorbic acid in food products using electrokinetic flow analysis-ion pair solid phase

- extraction-capillary zone electrophoresis, *Analytica Chimica Acta*, **618** (2008) 79-85.
- [65] Wey R., Li W., Yhang L., Jiang Y., Xie T., Online preconcentration in capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for sensitive determination of sorbic and benzoic acids in soy sauce, *Talanta*, **83** (2011) 1487-1490.
- [66] Zhang X., Xu S., Sun Y., Wang Y., Wang C., Simultaneous Determination of Benzoic Acid and Sorbic Acid in Food Products by CE after On-line Preconcentration by Dynamic pH Junction, *Chromatographia*, **73** (2011) 1217-1221.
- [67] Garcia-Cañas V., Simó C., Castro-Puyana M., Cifuentes A., Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics, *Electrophoresis*, **35** (2014) 147-169.
- [68] Liu F., Ding G., Tang A., Simultaneous separation and determination of five organic acids in beverages and fruits by capillary electrophoresis using diamino moiety functionalized silica nanoparticles as pseudostationary phase, *Food Chemistry*, **145** (2014) 109-114.
- [69] Sun B., Qi L., Wang M., Determination of preservatives in soft drinks by capillary electrophoresis with ionic liquids as the electrolyte additives, *Journal of Separation Science*, **37** (2014) 2248-2252.
- [70] Boyce M. C., Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography A*, **847** (1999) 369-375.
- [71] Ren L., Meng M., Wang P., Xu Z., Eremin S. A., Zhao J., Yin Y., Xi R., Determination of sodium benzoate in food products by fluorescence polarization immunoassay, *Talanta*, **121** (2014) 136-143.
- [72] Marsili N. R., Lista A., Band B. S. F., Goicoechea H. C., Olivieri A. C., New Method for the Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Commercial Orange Juics Based on Second-Order Spectrophotometric Data Generated by a pH Gradient

- Flow Injection Technique, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52** (2004) 2479-2484.
- [73] Jorge T. F. P., **Nutrientes e Suplementos Nutricionais em Vegetais e Frutos frequentemente usados na Dieta: Estudo por Espectrometria de Massa do Resveratrol nas Uvas**, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2012.
- [74] Greibrokk T., The Contributions of Csaba Horváth to liquid chromatography, *Journal of Separation Science*, **27** (2004) 1249-1254.
- [75] Kenndler E., Dickert F., Tribute to J. F. k. Huber, *Jornal of Analytical Chemistry*, **371** (2001) 2-3.
- [76] Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan J. W., Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd Ed., Wiley, 2010.
- [77] Skoog D. A., Holler F. j., Crouch S. R., Principles of Instrumental Analysis, 6th Ed., Thomson Brooks/Cole, 2007.
- [78] Chhabra N., Theory notes . Chromatography, Biochemistry for medics, disponível em: <http://www.namrata.co/category/biochemical-techniques/theory-notes-biochemical-techniques/>.
- [79] Champion B., HPLC Separation Fundamentals, Agilent Technologies, Inc., 2009.
- [80] Siouffi A. M., HPLC in: Nollet L. M. L. (ed.), Food Analysis by HPLC, 2nd Ed., Marcel Dekker, Inc., 2000.
- [81] Claessens H. A., Trends and progress in the characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography, *Trends in Analytical Chemistry*, **20** (2001) 563-583.
- [82] Layne J., Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid

- chromatography stationary phases, *Journal of Chromatography A*, **957** (2002) 149-164.
- [83] Claessens H. A., Straten M. A., Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **1060** (2004) 23-41.
- [84] Ribani M., Bottoli C. B. G., Collins C. H., Jardim I. C. S. F., Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos, *Química Nova*, **27** (2004) 771-780.
- [85] RELACRE, Guia Relacre 13, *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, Instituto Português da Qualidade, Portugal, 2000.
- [86] González A. G., Herrador M. A., A practical guide to analytical method validations, including measurement uncertainty and accuracy profiles, *Trends in Analytical Chemistry*, **26** (2007) 227-238.
- [87] INMETRO, *Normalização e Qualidade Industrial . Orientação sobre a validação de métodos de ensaios químicos*, Instituto Nacional de Metrologia, DOQ-CGCCRE-008, 2007.
- [88] ICH, *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, International Conference on Harmonisation, 1995.
- [89] Figueiredo T. M. P., **Validação de Métodos Analíticos É Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar**, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, 2012.
- [90] Center for Drug Evaluation and Research, Reviewer Guidance . Validation of Chromatographic Methods, Novembro 1994.
- [91] Barros C. B., Validação de métodos Analíticos, *Biológico*, São Paulo, 2002.
- [92] Henriques M. L. G. S., **Hormonas naturais e de síntese, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: optimização do método de análise por SPE-LC-ESI-MS/MS**, Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2008.

- [93] Guia ISO/IEC, Vocabulário Internacional de Metrologia, Instituto Português da Qualidade, 2008.
- [94] IPAC, *Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos*, Instituto Português de Acreditação, 2007.
- [95] Sousa J. A., Reynolds A. P., Delgado I. S., Marques J. C., Teixeira L. M., Jesus C. G., Estudo comparativo de diferentes métodos na avaliação de incertezas de medição em metrologia química, in METROLOGIA E INOVAÇÃO . 2ª Conferência Nacional, Funchal, 2007.
- [96] Parreira D., **Validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para doseamento da vitamina D em géneros alimentícios. Aplicação do método em diferentes matrizes alimentares**, Tese de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2013.
- [97] Veiga C., Serra C., Vasco E., Validation of a HPLC-UV method for the simultaneous determination of acesulfame k, saccharin and aspartame in tabletop intense sweeteners, XVII Euroanalysis . Analytical chemistry for human well-being and sustainable development, Varsóvia, Polónia, Agosto 2013.
- [98] Departamento de alimentação e Nutrição, Controlo da Qualidade Interno . Métodos Cromatográficos, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2012.
- [99] Diretiva 2002/67/CE
- [100] Lino C.M., Costa I.M., Pena A., Ferreira R., Cardoso S.M., Estimated intake of the sweeteners acesulfame-K and aspartame from soft drinks, soft drinks based on mineral waters and nectars for a group of Portuguese teenage students, *Food Additives & Contaminants - Part A*, **25** (2008) 1291. 1296.

- [101] Diogo J.S.G., Silva L.S.O. , Pena A., Risk assessment of additives through soft drinks and nectars consumption on Portuguese population: A 2010 survey, *Food and Chemical Toxicology*, **62** (2013) 548-553.
- [102] Ree M., Stoa E., Simultaneous determination of aspartame, benzoic acid, caffeine, and saccharin in sugar-free beverages using HPLC, *Concordia College Journal of Analytical Chemistry*, **1** (2011) 73-77.
- [103] CASSIANO N. M., Barreiro J. C., Martins L. R. R., Oliveira R. V., Cass Q. B., Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas, *Química Nova*, **32** (2009) 1021-1030.
- [104] Garcia A., Analytical considerations, Whorld Health Organization, Kiev, Outubro, 2009.

ANEXOS

ANEXO I - Folha de cálculo para determinação da humidade no padrão de aspartame

Cálculo da Humidade da amostra

| | | | |
|---|----------|------------------------|--------|
| Peso Cápsula (g) | 110,971 | Peso amostra (mg) | 0,2031 |
| Peso Cápsula + Aspartame (g) | 111,1741 | | |
| Peso Cápsula + Aspartame após secagem (g) | 111,164 | Peso amostra seca (mg) | 0,193 |
| Humidade (mg) | 0,0101 | | |
| Massa de água na amostra (mg) | 2,4865 | | |
| Massa de padrão real (mg) | 47,5135 | | |
| Concentração solução padrão (mg/ml) | 0,9503 | | |

Tabela 26 É Concentração corrigida do aspartame ($\mu\text{g/mL}$) nas soluções padrão de calibração.

| Solução stock (1 mg/mL) | Volume de Solução Stock (mL) | Concentração da Solução Padrão ($\mu\text{g/mL}$) | Concentração corrigida ($\mu\text{g/mL}$) |
|----------------------------|---------------------------------|--|--|
| Padrão 1 | 0,2 | 4,0 | 3,8 |
| Padrão 2 | 0,5 | 10,0 | 9,5 |
| Padrão 3 | 0,8 | 16,0 | 15,2 |
| Padrão 4 | 1,2 | 24,0 | 22,8 |
| Padrão 5 | 1,6 | 32,0 | 30,4 |
| Padrão 6 | 2,0 | 40,0 | 38,0 |

Na **Tabela 27**, estão indicadas as concentrações corrigidas das respetivas soluções de aspartame para os vários ensaios realizados.

Tabela 27 - Concentração corrigida das soluções padrão de calibração de aspartame ($\mu\text{g/mL}$).

| Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | | | | |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 3,80 | 3,63 | 3,81 | 3,83 | 3,57 |
| 9,50 | 9,08 | 9,51 | 9,58 | 8,92 |
| 15,20 | 14,52 | 15,22 | 15,32 | 14,27 |
| 22,81 | 21,78 | 22,83 | 22,98 | 21,40 |
| 30,41 | 29,04 | 30,44 | 30,64 | 28,54 |
| 38,01 | 36,31 | 38,06 | 38,30 | 35,67 |

ANEXO II - Folha de cálculo para o teste de homogeneidade das variâncias

| Conc. | | Sinal (y_{ij} =Área do pico i ,ensaio j) | | | | | | | | | |
|-------|-------------------------------|--|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| i | x_i ($\mu\text{g/ml}$) | ensaio 1 | ensaio 2 | ensaio 3 | ensaio 4 | ensaio 5 | ensaio 6 | ensaio 7 | ensaio 8 | ensaio 9 | ensaio 10 |
| 1 | 4,000 | 117015,00000 | 126204,50000 | 124059,00000 | 106142,50000 | 123779,50000 | 105547,00000 | 121897,00000 | 112989,50000 | 123785,50000 | 119566,50000 |
| 2 | 10,000 | 275868,50000 | | | | | | | | | |
| 3 | 16,000 | 440563,00000 | | | | | | | | | |
| 4 | 24,000 | 673783,50000 | | | | | | | | | |
| 5 | 32,000 | 887391,00000 | | | | | | | | | |
| 6 | 40,000 | 1119068,00000 | 1100380,00000 | 1111623,50000 | 1109401,00000 | 1115932,00000 | 1101975,50000 | 1108055,00000 | 1103602,00000 | 1104004,50000 | 1096374,00000 |

Média y_1 = 118098,60
 Desvio Padrão y_1 = 7529,17
 CV% y_1 = 6,38
 Variância y_1 = 56688455

Média y_{10} = 1107041,55
 Desvio Padrão y_{10} = 7119,27
 CV% y_{10} = 0,64
 Variância y_{10} = 50683985

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^N (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{j=1}^n y_{ij}}{n_i}$$

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}$$

SE

$$S_{10}^2 > S_1^2$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}$$

SE

$$S_1^2 > S_{10}^2$$

PG = 1,118468786

$F_{(n10-1, n10-1, 99,0 \%)} = 5,35$

PG<F OK

PG>F

ANEXOS

ANEXO III - Folha de cálculo para o teste de linearidade (Mandel)

| i | Ajuste Linear $(y_i - \hat{y}_i)^2$ | Ajuste Polinomial $(y_i - \hat{y}_i)^2$ | | |
|----------------------------|--|--|---|-----------------------------|
| 1 | 7,678321E+07 | 3,126188E+07 | Ajuste Linear $S_{y_1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}}$ | $S_{y_1} = 7,296117427E+03$ |
| 2 | 4,042524E+06 | 1,347382E+06 | | |
| 3 | 7,967791E+06 | 6,805028E+06 | | |
| 4 | 1,073039E+07 | 9,373669E+06 | | |
| 5 | 2,826047E+07 | 9,430416E+06 | | |
| 6 | 3,566548E+07 | 1,388977E+07 | Ajuste Polinomial $S_{y_2} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-3}}$ | $S_{y_2} = 7,176543372E+03$ |
| 7 | 4,020196E+07 | 8,440016E+07 | | |
| 8 | 7,330563E+06 | 3,084643E+07 | | |
| 9 | 1,758074E+07 | 9,941218E+06 | | |
| 10 | 3,191052E+07 | 2,124260E+07 | | |
| 11 | 5,404279E+07 | 1,107898E+08 | | |
| 12 | 2,178169E+08 | 1,341966E+08 | | |
| $\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$ | 5,323333E+08 | 4,635250E+08 | | |
| N | 12 | 12 | | |

| Diferença das variâncias | Valor do teste |
|--|-------------------------------|
| $DS^2 = (N-2) \cdot S_{y_1}^2 - (N-3) \cdot S_{y_2}^2$ | $PG = \frac{DS^2}{S_{y_2}^2}$ |

$$F_{(1, N-3, 99\%)} = 10,56143105$$

$$PG = 1,336011941$$

| | | |
|--------|----|--|
| PG < F | OK | O ajuste polinomial não é significativamente melhor que o linear |
| PG > F | . | O ajuste polinomial é significativamente melhor que o linear |

$$DS^2 = 6,88083221E+07$$

ANEXO IV - Folha de cálculo para a determinação da concentração do analito nos ensaios de repetibilidade

PARÂMETRO:

Acido Benzoico

Nº/Data de Entrada:

338623 | 11/06/2014

Amostra:

Marmelada (A7)

Observações:

| Toma de Amostra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|-----------------|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Data de início de análise: | 01/08/2014 | | | | | |
| Executante: | JCC | | | | | |
| Pasta Nº: | | | | | | |
| Diluição na técnica | 1 | | | | | |
| Rectas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL) | | | | | | |
| Resíduos ≤ 10 % | sim | | | | | |
| Coeficiente correlação (r) ≥ 0,995 | sim | | | | | |
| Toma da amostra (g) | 5,1992 | 5,0149 | 5,2246 | 5,0405 | 5,2775 | 5,1011 |
| Volume em que a amostra é diluída (mL) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Diluição posterior | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Concentração Sol. Analisadas (µg/mL) | 19,7330 | 19,1430 | 19,5560 | 19,1810 | 19,8820 | 18,9970 |
| Concentração da Toma de Amostra (mg/kg amostra) | 379,539 2 | 381,7225 | 374,306 2 | 380,537 6 | 376,731 4 | 372,409 9 |
| Concentração Média da Amostra (mg/kg Amostra) | 377,5411 | | | | | |
| repetibilidade (CV _r =5%) | OK | | | | | |
| r (repetibilidade) | 75,5082 | | | | | |
| Data de fim de análise | 12/06/2014 | | | | | |

ANEXO V - Folha de cálculo do desvio padrão relativo de repetibilidade (RSD_r)

| | | | |
|----------------------|------------------------------|-------------|-------------|
| Natureza da amostra | 338643 | | |
| Descrição da amostra | Pão em fatias - Ácido Sórico | | |
| Método | EN 12856 | | |
| DADOS / série | SS20140604A | SS20140620A | SS20140701A |
| data de análise | 04/06/2014 | 30/06/2014 | 14/07/2014 |
| série(i) | 1 | 2 | 3 |
| n | | | |
| 1 | 1358,7962 | 1160,7090 | 1339,5397 |
| 2 | 1357,1671 | 1199,0883 | 1211,7658 |
| 3 | 1331,7238 | 1116,4654 | 1370,0060 |
| 4 | 1344,2115 | 1208,7834 | 1364,2192 |
| 5 | 1336,1439 | 1189,9579 | 1349,3359 |
| 6 | 1309,7714 | 1229,6044 | 1351,4193 |

| | | | | | |
|---------------------------------|------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
| Nº ensaios por Operador | n | | 6 | 6 | 6 |
| Média | \bar{x} | | 1339,6357 | 1184,1014 | 1331,0477 |
| Desvio Padrão | S | | 18,23227871 | 40,1508724 | 59,44382832 |
| Variância | S^2 | | 332,415987035 | 1612,092554124 | 3533,568725707 |
| CV% | CV% | | 1,360987871 | 3,390830582 | 4,465942923 |
| Desvio padrão da repetibilidade | S_{ri} | 59,44382832 | | | |
| Variância da repetibilidade | S_{ri}^2 | 3533,568725707 | | | |
| Limite de repetibilidade | r | 166,4427193 | | | |

ANEXO VI - Folha de cálculo do desvio padrão relativo de precisão intermédia (RSD_R)

| | | | | | | | |
|--|---------------------|----------------------|-------------------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| | | Natureza da amostra | 338643 | | | | |
| | | Descrição da amostra | Panrico - Ácido Sórbico | | | | |
| DADOS DE PRECISÃO | | Método | EN 12856 | | | | |
| | | DADOS / série | SS20140604A | | SS20140620A | | SS20140701A |
| | | data de análise | 04/06/2014 | | 30/06/2014 | | 14/07/2014 |
| | | série(i) | 1 | | 2 | | 3 |
| | | n | $y_{i,n}$ | $(y - \bar{y})$ | $y_{i,n}$ | $(y - \bar{y})$ | $y_{i,n}$ |
| | | 1 | 1358,7962 | 73,86796667 | 1160,709 | -124,2192333 | 1339,5397 |
| | | 2 | 1357,1671 | 72,23886667 | 1199,0883 | -85,83993333 | 1211,7658 |
| | | 3 | 1331,7238 | 46,79556667 | 1116,4654 | -168,4628333 | 1370,006 |
| | | 4 | 1344,2115 | 59,28326667 | 1208,7834 | -76,14483333 | 1364,2192 |
| | | 5 | 1336,1439 | 51,21566667 | 1189,9579 | -94,97033333 | 1349,3359 |
| | | 6 | 1309,7714 | 24,84316667 | 1229,6044 | -55,32383333 | 1351,4193 |
| Nº de ensaios por operador | n | | 6 | | 6 | | 6 |
| Média dos ensaios de todos os operadores (N ensaios) | \bar{y} | 1284,928233 | | | | | |
| Numero total de determinações total | N | 18 | | | | | |
| | $n (y - \bar{y})^2$ | 119106,1004 | | | | | |
| Desvio padrão da precisão intermédia | S_{Pi} | 83,70329266 | | | | | |
| Variância da precisão intermédia | S_{Pi}^2 | 7006,241203 | | | | | |
| Limite de precisão intermédia | P_i | 234,3692195 | | | | | |
| CV% | CV% | 6,514238733 | | | | | |

$$Spi_{(T.O.)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^N (y_k - \bar{y})^2}$$

$$P_i = 2,8 \sqrt{S_{Pi}^2}$$

ANEXO VII Ë Resultados obtidos durante os ensaios de repetibilidade e precisão intermédia

Tabela 28 Ë Concentração (média \pm desvio padrão) de cada analito para as amostras de refrigerantes analisadas nos ensaios de repetibilidade e precisão intermédia.

| Amostra | Analito | Dia | Concentração | CV (%) | |
|---------------|----------------|-----|--------------------------|----------------|---------------------|
| | | | ($\bar{x} \pm \sigma$) | Repetibilidade | Precisão Intermédia |
| | | | (mg/kg ou mg/L) | | |
| Refrigerantes | | | | | |
| A2 | Acessulfame-K | 1 | 44 ± 0,4 | 0,8 | 2,5 |
| | | 2 | 43 ± 0,3 | 0,8 | |
| | | 3 | 42 ± 0,4 | 0,9 | |
| | Aspartame | 1 | 63 ± 2,6 | 4,1 | 5,0 |
| | | 2 | 70 ± 1,1 | 1,5 | |
| | | 3 | 68 ± 0,6 | 0,9 | |
| | Ácido Benzoico | 1 | 114 ± 3,2 | 2,8 | 3,0 |
| | | 2 | 120 ± 0,8 | 0,7 | |
| | | 3 | 114 ± 0,5 | 0,4 | |
| | Ácido Sórbico | 1 | 110 ± 2,5 | 2,3 | 5,5 |
| | | 2 | 123 ± 4,5 | 3,7 | |
| | | 3 | 115 ± 1,0 | 0,8 | |
| A19 | Acessulfame-K | 1 | 91 ± 0,9 | 1,0 | 3,0 |
| | | 2 | 86 ± 1,0 | 1,2 | |
| | | 3 | 86 ±1,7 | 2,0 | |
| | Aspartame | 1 | 232 ± 1,7 | 0,7 | 1,7 |
| | | 2 | 238 ± 5,1 | 2,1 | |
| | | 3 | 235 ± 2,4 | 1,0 | |
| | Cafeína | 1 | 114 ±1,0 | 0,9 | 3,3 |
| | | 2 | 108 ± 1,5 | 1,4 | |
| | | 3 | 116 ± 0,6 | 0,5 | |
| | Ácido Benzoico | 1 | 145 ± 1,5 | 1,0 | 1,3 |
| | | 2 | 144 ± 1,5 | 1,0 | |
| | | 3 | 148 ± 0,9 | 0,6 | |
| A21 | Acessulfame-K | 1 | 59 ± 0,4 | 0,7 | 3,8 |
| | | 2 | 54 ± 0,2 | 0,4 | |
| | | 3 | 57 ± 0,3 | 0,5 | |
| | Aspartame | 1 | 21 ± 0,7 | 3,5 | 5,2 |
| | | 2 | 23 ± 0,2 | 1,1 | |
| | | 3 | 23 ± 0,3 | 1,3 | |
| | Sacarina | 1 | 57 ± 0,4 | 0,7 | 5,9 |
| | | 2 | 59 ± 0,2 | 0,4 | |
| | | 3 | 65 ± 0,4 | 0,6 | |
| | Ácido Benzoico | 1 | 104 ± 0,9 | 0,8 | 2,9 |
| | | 2 | 107 ± 0,5 | 0,4 | |
| | | 3 | 111 ± 0,5 | 0,5 | |
| | Ácido Sórbico | 1 | 94 ± 1,1 | 1,1 | 4,4 |
| | | 2 | 99 ± 0,5 | 0,5 | |
| | | 3 | 104 ± 0,6 | 0,6 | |

(Continua na Tabela 29)

Tabela 29 - Concentração (média \pm desvio padrão) de cada analito para as amostras de iogurtes e marmeladas analisadas nos ensaios de repetibilidade e precisão intermédia.

| Amostra | Analito | Dia | Concentração | CV (%) | |
|------------|----------------|-----|--|----------------|---------------------|
| | | | $(\bar{\chi} \pm \sigma)$ (mg/kg ou mg/L) | Repetibilidade | Precisão Intermédia |
| Iogurtes | | | | | |
| A13 | Acessulfame-K | 1 | 157 ± 2,5 | 1,6 | 1,3 |
| | | 2 | 159 ± 1,4 | 0,9 | |
| | | 3 | 156 ± 0,9 | 0,6 | |
| | Aspartame | 1 | 136 ± 5,8 | 4,3 | 3,3 |
| | | 2 | 131 ± 3,5 | 2,7 | |
| | | 3 | 132 ± 1,6 | 1,2 | |
| | Ácido Sórbico | 1 | 107 ± 1,8 | 1,6 | 3,0 |
| | | 2 | 105 ± 1,8 | 1,7 | |
| | | 3 | 112 ± 1,5 | 1,3 | |
| Marmeladas | | | | | |
| A5 | Ácido Benzoico | 1 | 340 ± 28,6 | 2,0 | 3,9 |
| | | 2 | 318 ± 17,0 | 2,6 | |
| | | 3 | 326 ± 2,5 | 0,8 | |
| | Ácido Sórbico | 1 | 381 ± 32,2 | 1,9 | 7,2 |
| | | 2 | 346 ± 21,5 | 3,3 | |
| | | 3 | 324 ± 4,6 | 1,4 | |
| A7 | Ácido Benzoico | 1 | 601 ± 7,1 | 1,2 | 2,8 |
| | | 2 | 618 ± 12,7 | 2,1 | |
| | | 3 | 633 ± 13,3 | 2,1 | |
| | Ácido Sórbico | 1 | 378 ± 3,7 | 1,0 | 2,2 |
| | | 2 | 390 ± 7,5 | 1,9 | |
| | | 3 | 390 ± 7,3 | 1,9 | |

(Continua na tabela 30)

ANEXOS

Tabela 30 - Concentração (média \pm desvio padrão) de cada analito para as amostras de molhos, produtos de pastelaria e panificação, analisadas nos ensaios de repetibilidade e precisão intermédia.

| Amostra | Analito | Dia | Concentração | CV (%) | |
|--|----------------|-----|--|----------------|---------------------|
| | | | ($\bar{\chi} \pm \sigma$) (mg/kg ou mg/L) | Repetibilidade | Precisão Intermédia |
| Molhos emulsionados e não-emulsionados | | | | | |
| A14 | Ácido Benzoico | 1 | 374 ± 1,2 | 0,3 | 2,7 |
| | | 2 | 393 ± 1,6 | 0,4 | |
| | | 3 | 397 ± 5,6 | 1,4 | |
| | Ácido Sórbico | 1 | 295 ± 3,0 | 1,0 | 1,7 |
| | | 2 | 304 ± 2,1 | 0,7 | |
| | | 3 | 304 ± 4,7 | 1,3 | |
| A15 | Ácido Sórbico | 1 | 660 ± 6,3 | 1,0 | 5,2 |
| | | 2 | 607 ± 12,8 | 2,1 | |
| | | 3 | 681 ± 10,1 | 1,5 | |
| A16 | Ácido Sórbico | 1 | 700 ± 11,2 | 1,6 | 4,7 |
| | | 2 | 656 ± 26,5 | 4,0 | |
| | | 3 | 718 ± 16,0 | 2,2 | |
| A22 | Ácido Sórbico | 1 | 1258 ± 24,3 | 1,9 | 1,6 |
| | | 2 | 1262 ± 10,4 | 0,8 | |
| | | 3 | 1235 ± 12,0 | 1,0 | |
| Produtos de Pastelaria | | | | | |
| A23 | Ácido Benzoico | 1 | 103 ± 4,1 | 4,0 | 2,9 |
| | | 2 | 105 ± 0,9 | 0,8 | |
| | | 3 | 107 ± 1,8 | 1,7 | |
| | Ácido Sórbico | 1 | 176 ± 6,4 | 3,6 | 2,3 |
| | | 2 | 176 ± 0,6 | 0,4 | |
| | | 3 | 177 ± 3,5 | 2,0 | |
| Produtos de Panificação | | | | | |
| A18 | Ácido Sórbico | 1 | 1340 ± 18,2 | 1,4 | 6,5 |
| | | 2 | 1184 ± 40,2 | 3,4 | |
| | | 3 | 1331 ± 59,4 | 4,5 | |

ANEXO VIII - Análise das Amostras (Cromatogramas)

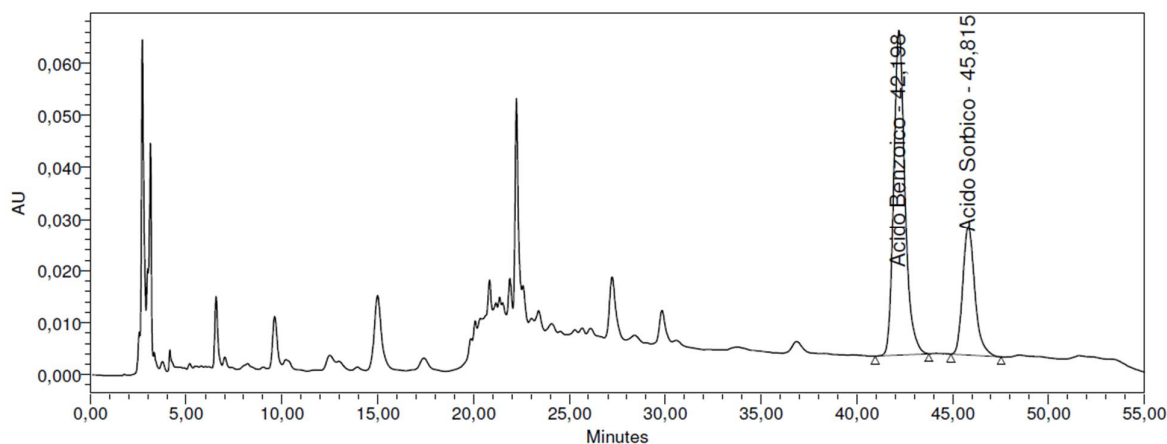


Figura 23 É Cromatograma relativo a uma amostra de marmelada com ácido benzoico ($t_r=42,2$ min) e ácido sórbico ($t_r=45,8$ min).

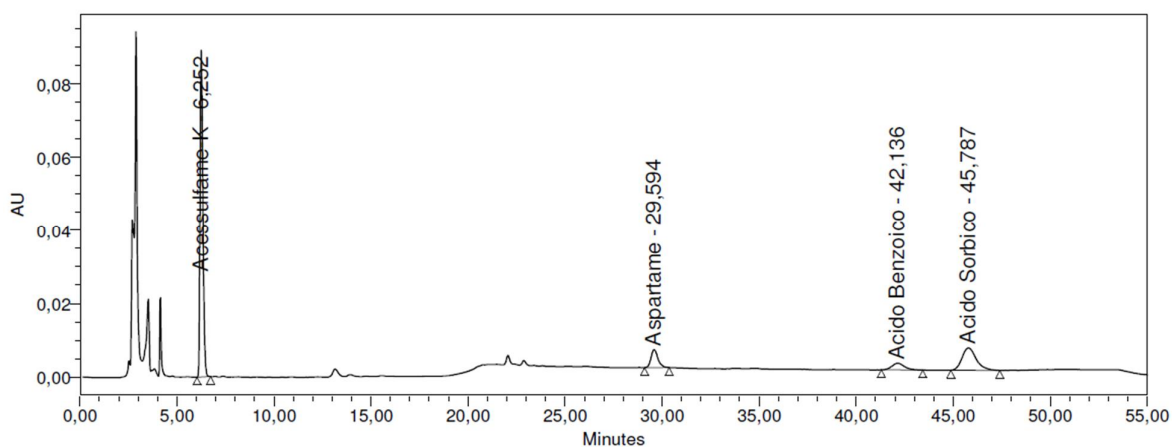


Figura 24 - Cromatograma relativo a uma amostra de iogurte com acessulfame-k ($t_r=6,2$ min), aspartame ($t_r=29,6$ min), ácido benzoico ($t_r=42,1$ min) e ácido sórbico ($t_r=45,8$ min).

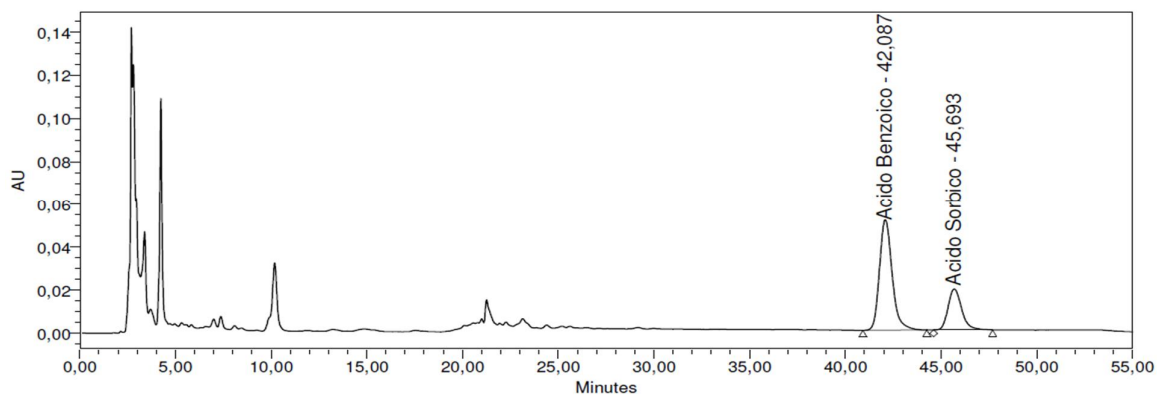


Figura 25 - Cromatograma relativo a uma amostra de ketchup com ácido benzoico ($t_r=42,1$ min) e ácido sórbico ($t_r=45,7$ min).

ANEXOS

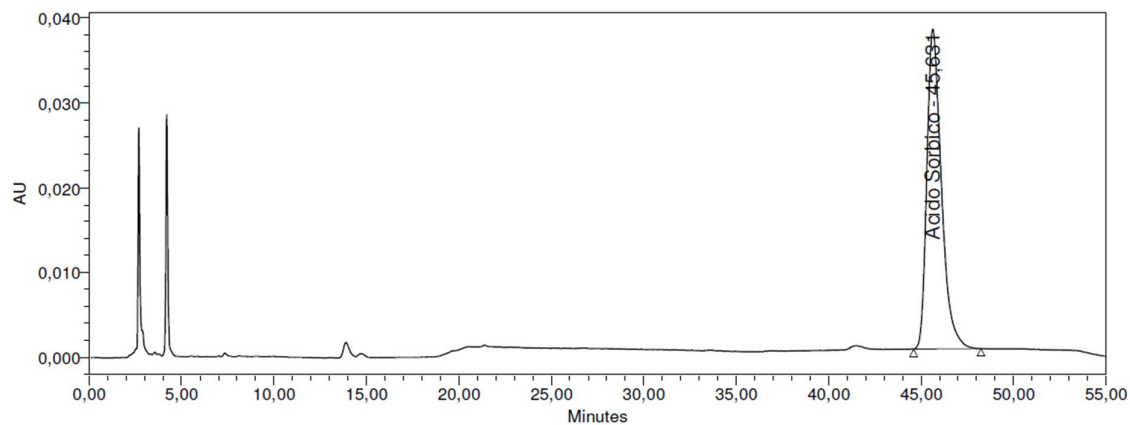


Figura 26 - Cromatograma relativo a uma amostra de maionese com ácido sórbico ($t_r=45,6$ min).

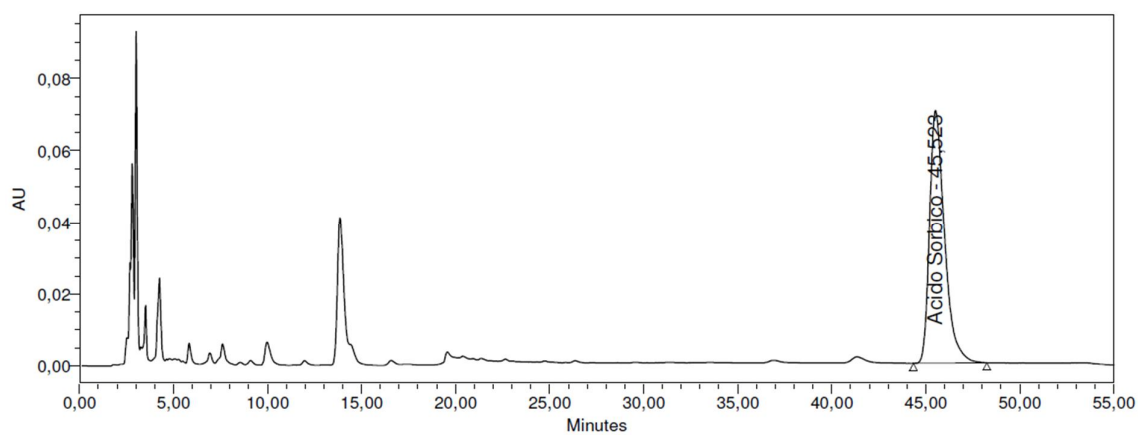


Figura 27 - Cromatograma relativo a uma amostra de pão em fatias com ácido sórbico ($t_r=45,5$ min).

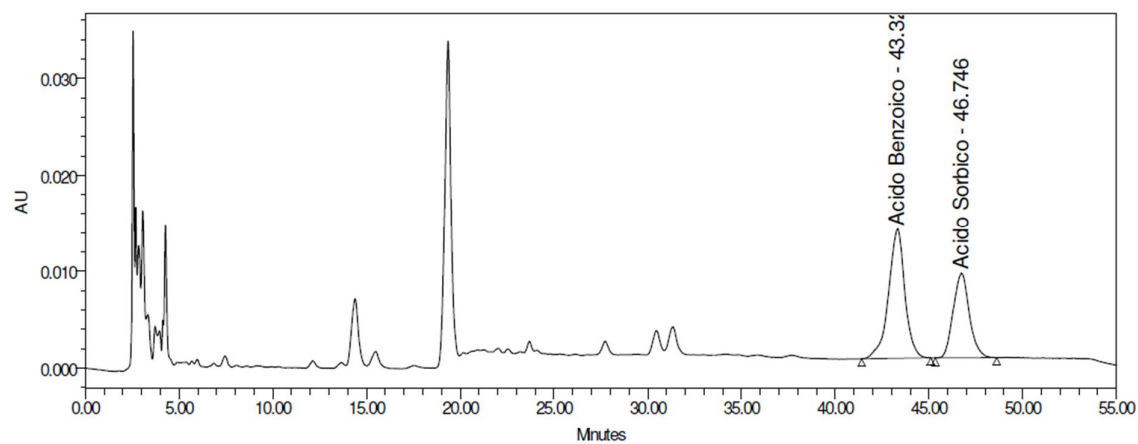


Figura 28 - Cromatograma relativo a uma amostra de bolo de pastelaria com ácido benzoico ($t_r=43,3$ min) e ácido sórbico ($t_r=46,7$ min).

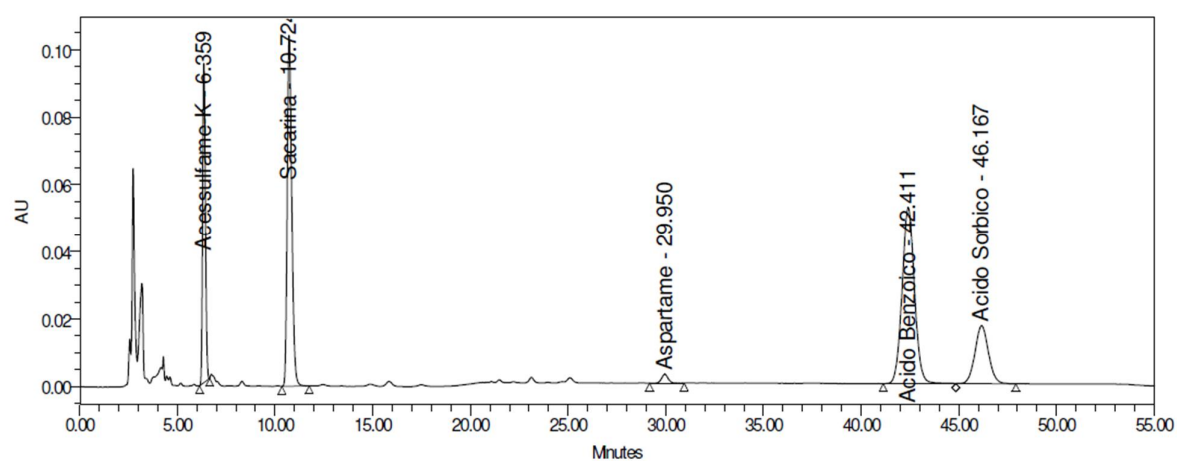


Figura 29 - Cromatograma relativo a uma amostra de refrigerante com acessulfame-k ($t_r=6,4$ min), sacarina ($t_r=10,7$ min) aspartame ($t_r=29,9$ min), ácido benzoico ($t_r=42,4$ min) e ácido sórbico ($t_r=46,2$ min).

ANEXO IX É Folha de cálculo para determinação do teor do analito na amostra e da taxa de recuperação (%)

| | | | | | | |
|--|------------------|---------|---------|----------------|---------|---------|
| PARÂMETRO: | Acido Sorbico | | | | | |
| Nº/Data de Entrada: | 338643 | | | | | |
| Amostra: | Panrico (A18) | | | | | |
| Observações: | SS20140604A | | | | | |
| | | | | | | |
| Toma de Amostra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Data de análise: | 04/06/2014 | | | | | |
| Executante: | JCC | | | | | |
| Pasta Nº: | | | | | | |
| Diluição na técnica | 1 | | | | | |
| Rectas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL) | | | | | | |
| Resíduos $\leq 10\%$ | Sim | | | | | |
| Coeficiente correlação (r) $\geq 0,995$ | Sim | | | | | |
| Toma da amostra (g) | 10,2475 | 10,0636 | 10,1066 | | | |
| Volume em que a amostra é diluída (mL) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Concentração do padrão (µg/mL) | | | 1000 | | | 1000 |
| Volume do padrão adicionado (mL) | | | 10,1 | | | |
| Diluição posterior | 1/5 | 1/5 | 1/5 | 1 | 1 | 1 |
| Concentração Sol. Analisadas (µg/mL) | 26,1310 | 26,5760 | 43,9510 | | | |
| Concentração da Toma de Amostra (mg/kg amostra) | 1274,99 | 1320,40 | 2174,37 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| Concentração Média da Amostra (mg/kg Amostra) | 1297,6981 | | | #DIV/0! | | |
| Repetibilidade (CV _r =5%) | OK | | | #DIV/0! | | |
| Taxa de recuperação (%) | 87,7 | | | #DIV/0! | | |
| r (repetibilidade) | 241,4556 | | | #DIV/0! | | |